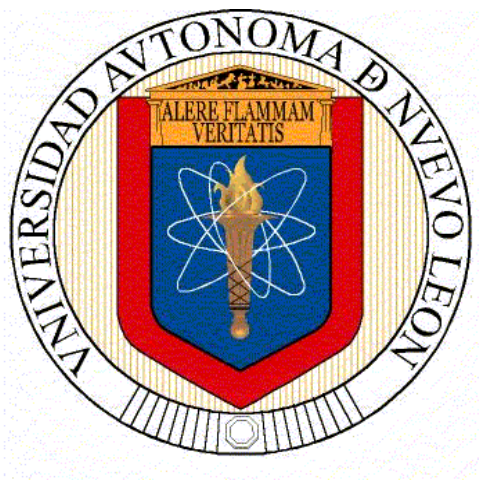


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE
ISONIAZIDA A PARTIR DE UN BIOMATERIAL CERÁMICO”**

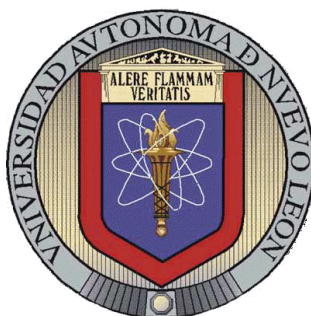
POR

TANIA OLIVIA RAMÍREZ MONTAÑO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
FARMACIA**

MARZO 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE
ISONIAZIDA A PARTIR DE UN BIOMATERIAL CERÁMICO”

Por

Q.F.B Tania Olivia Ramírez Montaña

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Farmacia

MARZO 2015

“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE ISONIAZIDA A PARTIR DE UN BIOMATERIAL CERÁMICO”

Aprobación de tesis

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
PRESIDENTE

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño
SECRETARIA

Dr. Omar González Santiago
VOCAL

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE ISONIAZIDA A PARTIR DE UN BIOMATERIAL CERÁMICO”

Revisión de la Tesis:

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Directora de tesis

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Co-directora de tesis

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño
Comité tutorial

Dr. Omar González Santiago
Comité tutorial

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez
Comité tutorial

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Tania Olivia Ramírez Montaña

Fecha de Graduación: Marzo del 2015.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE ISONIAZIDA A PARTIR DE UN BIOMATERIAL CERÁMICO.

Número de páginas: 74

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias Químicas con
Orientación en Farmacia

Área de Estudio:

Propósito y Método del Estudio: La tuberculosis es un serio problema de salud pública, esta enfermedad representa la segunda causa de muerte ocasionada por un agente infeccioso. Una de las razones de la elevada tasa de morbi-mortalidad es la multifarmacorresistencia desarrollada por la bacteria, dicha resistencia es más frecuente en infecciones que requieren un tratamiento prolongado, lo cual conduce a mayor riesgo de incumplimiento por parte del paciente. Considerando la problemática asociada al tratamiento de la tuberculosis, el desarrollo de un sistema que libere isoniazida de manera sostenida representa una forma para mejorar el cumplimiento de la terapia, permitiendo mantener las concentraciones plasmáticas del fármaco en el rango terapéutico y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia por el *Mycobacterium tuberculosis*.

Contribuciones y Conclusiones: En el presente trabajo de investigación se evaluaron las características de liberación de la isoniazida incorporada en una matriz cerámica a base de SiO₂ a condiciones fisiológicas *in vitro*. La síntesis del biomaterial se realizó vía sol-gel a diferentes condiciones de pH y relación TEOS/Agua. El material cerámico conteniendo la isoniazida fue caracterizado mediante técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas. Se realizaron pruebas de extracción para determinar la incorporación de isoniazida en el biomaterial, así como ensayos *in vitro* para evaluar las características de liberación de isoniazida en solución acuosa a pH fisiológico y mediante la determinación de permeabilidad en membranas artificiales. La cinética de liberación a pH fisiológico ocurrió en dos fases y esta dependió directamente de la morfología y de las propiedades texturales de la matriz, el factor más importante fue la porosidad, mientras que el estudio de permeabilidad de isoniazida en membranas artificiales indica que no se ve afectada cuando esta se incorporó en los biomateriales.

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas (Asesora)

AGRADECIMIENTOS

Para ti que siempre en cualquier circunstancia y lugar me reconfortas.

Gracias Dios

Por ser mi mayor apoyo, por tu amor y paciencia.

Jorge

Por siempre demostrarme su amor, cariño y comprensión.

Papá y Mamá

Por ser mi mayor motivación.

Liz, Alondra y Vane

Por su amistad, comprensión y compañía en todo momento.

Lynette, Esther y Erik

Por otorgarme la oportunidad de realizar el proyecto bajo su supervisión, por su
apoyo, paciencia y enseñanzas.

Dra. Lucía y Dra. Araceli

A cada uno de los maestros que fortalecieron mi aprendizaje y brindaron su apoyo
siempre de la UANL.

En especial al Dr. Jorge, Dra. Paty, Dr. Omar y Dra. Sandra

A la UANL y a Conacyt por financiar mis estudios del posgrado.

A la UNC por darme la oportunidad de realizar una estancia y por todos los
conocimientos adquiridos. Dra. Marcela, Dra. Caro y Dra. Claudia

Tabla de Contenido

Índice de figuras	v
Índice de tablas.....	vi
Nomenclatura	vii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 BIOMATERIALES	1
1.1.1 Propiedades principales de los biomateriales	3
1.2 MATERIALES CERÁMICOS	4
1.2.1 Técnica sol-gel para la síntesis de materiales cerámicos.....	7
1.2.2 Materiales cerámicos como sistema de liberación prolongada para fármacos .	9
1.3 LIBERACIÓN PROLONGADA.....	11
1.3.1 Efecto en la eficacia terapéutica	12
1.4 TUBERCULOSIS	13
1.4.1 Tuberculosis multirresistente.....	16
1.5 ISONIAZIDA.....	16
1.5.1 Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas	16
1.5.2 Mecanismo de acción	18
1.5.3 Farmacocinética/Farmacodinamia	19
1.5.4 Formas comerciales.....	19
1.5.5 Uso terapéutico de la isoniazida	20
1.6 PERMEABILIDAD DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES	23
1.6.1 Paso de fármacos a través de membranas celulares	24
1.7 ANTECEDENTES	27
2. HIPÓTESIS.....	32
3. OBJETIVO GENERAL	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. METAS	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 Síntesis de los biomateriales	35
5.2 Caracterización de los biomateriales	37

5.2.1	Análisis térmico (ATG-ATD)	37
5.2.2	Difracción de rayos-X (DRX)	37
5.2.3	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	37
5.2.4	Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS)	38
5.2.5	Análisis textural: BET-BHJ	38
5.2.6	Análisis elemental	38
5.3	Identificación y cuantificación de isoniazida por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	39
5.3.1	Curva de calibración	40
5.4	Pruebas de Extracción	42
5.5	Pruebas de liberación <i>in vitro</i>	43
5.6	Estudios de permeabilidad de INH utilizando membranas artificiales a partir de los biomateriales como sistemas de liberación prolongada	45
6.	RESULTADOS y DISCUSIONES	48
6.1	Biomateriales Sintetizados	48
6.2	Caracterización de los biomateriales	49
6.2.1	Análisis térmicos de isoniazida, sílice y biomateriales secos	49
6.2.2	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	52
6.2.3	Difracción de rayos-X	54
6.2.4	Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (MEB-EDX)	56
6.2.5	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS)	58
6.2.6	Análisis textural	60
6.4	Pruebas de Extracción	62
6.5	Estudios de los perfiles de liberación	63
6.6	Estudio de la liberación de INH a partir de biomateriales mediante un sistema de difusión dinámico empleando membranas artificiales	67
7.	CONCLUSIONES	70
8.	BIBLIOGRAFÍA	72

Índice de figuras

Figura 1. Aplicaciones principales de los biomateriales.	1
Figura 2. Propiedades principales de los biomateriales.	3
Figura 3. Primeros materiales cerámicos utilizados en aplicaciones médicas.	5
Figura 4. Matrices cerámicas para liberación de fármacos.	6
Figura 5. Estructura mesoporosa del óxido de silicio "sílice".	10
Figura 6. Mecanismo de acción de INH	18
Figura 7. Celdas de difusión de Franz.	23
Figura 8. Etapas del proceso sol-gel para la síntesis del biomaterial e incorporación de la isoniazida.	36
Figura 9. Equipo HPLC Waters	39
Figura 10. Cromatograma de isoniazida.	40
Figura 11. Curva de calibración para INH.	42
Figura 12. Disolutor Vankel con canastilla.	44
Figura 13. Ensayo de permeabilidad con celdas de difusión de Franz.	46
Figura 14. Biomateriales sintetizados por la técnica sol-gel.	48
Figura 15. ATG-ATD isoniazida.	50
Figura 16. ATG-ATD SiO ₂	51
Figura 17. ATG-ATD Biomateriales.	52
Figura 18. Espectro FTIR de isoniazida.	53
Figura 19. Espectro de los biomateriales.	54
Figura 20. Patrones DRX de biomateriales, SiO ₂ , y INH.	55
Figura 21. Micrografías de las muestras analizadas sintetizadas por sol-gel.	57
Figura 22. Análisis EDS y porcentaje de los pesos de los elementos a partir de la sílice y biomateriales	58
Figura 23. Isotermas de adsorción de N ₂ para los biomateriales sintetizados.	60
Figura 24. Cinética de liberación de isoniazida en la primera fase "Corta duración".	63
Figura 25. Cinética de liberación Fase 1 "Corta duración" y 2 "Larga duración".	64
Figura 26. Perfiles de permeabilidad de INH y biomateriales.	67

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades de INH: Fisicoquímicas y Biofarmacéuticas.	17
Tabla 2. Fármacos de primera y segunda línea para tratar TB	21
Tabla 3. Condiciones de síntesis para los biomateriales sintetizados vía sol-gel..	35
Tabla 4. Estándares preparados para la curva de calibración de INH.	41
Tabla 5. Condiciones de extracción para INH a través de los biomateriales.....	43
Tabla 6. Tiempos a los que fueron tomadas las alícuotas para las pruebas <i>in vitro</i> de liberación de INH.....	44
Tabla 7. Composición de la membrana artificial utilizada para estudios de liberación mediante la permeabilidad de isoniazida.	45
Tabla 8. Resultados de análisis elemental.	59
Tabla 9. Características texturales obtenidas a partir de las isothermas de adsorción-desorción de los materiales.	61
Tabla 10. Resultados de extracción de los biomateriales sintetizados vía sol-gel.	62
Tabla 11. Análisis elemental del B3.1.8 después de la extracción.	62
Tabla 12. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) y fracción de dosis absorbida (Fa%) obtenidos para INH y los biomateriales.	68

Nomenclatura

ACN Acetonitrilo

ATD Análisis térmico diferencial

ATG Análisis termogravimétrico

BDDT (Brunauer, Deming, Deming y Teller)

BET Brunauer-Emmet-Teller

BJH Barrett-Joyner-Halenda

DRX Difracción de Rayos-X

EDS Espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X

FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

FTIR Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

I.M. Intramuscular

I.V. Intravenosa

INH Isoniazida

MEB Microscopía electrónica de barrido

MEB-EDX Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X.

P/Po Presión relativa

P_{app} Coeficientes de permeabilidad aparente

PBS Buffer de fosfatos

ppm Partes por millón

rpm Revoluciones por minuto

SCB Sistema de clasificación biofarmacéutico

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SRF Solución reguladora de fosfatos

TB Tuberculosis

TB-MR Tuberculosis multirresistente

TB-XDR Tuberculosis ultrarresistente

TEOS Tetraetil ortosilicato

USP Farmacopea de Estados Unidos

UV Ultravioleta

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

w/w Porcentaje peso/peso

1. INTRODUCCION

1.1 BIOMATERIALES

En la actualidad se han descubierto un sin número de posibilidades en cuanto a la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos y terapias con el fin de otorgar al paciente una mejor calidad de vida, ya sea mediante la prevención, el tratamiento de los síntomas o la cura de su enfermedad. Los biomateriales se han convertido en los últimos años en un campo interesante para la investigación, principalmente en especialidades en ciencias, ingenierías, medicina y biología; estas ramas los han considerado como una necesidad clínica y con excelentes aplicaciones para la generación de material de uso biomédico, la realización de estudios biológicos y el desarrollo de nuevas terapias (Figura 1) [1, 2].

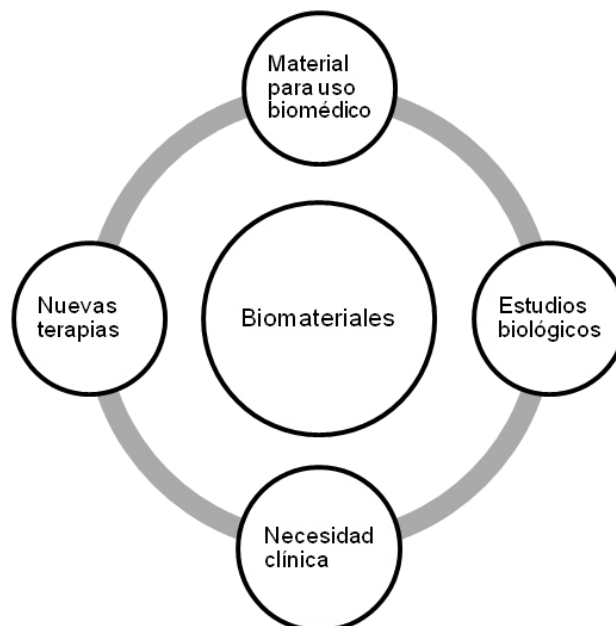


Figura 1. Aplicaciones principales de los biomateriales.

Los biomateriales son todos aquellos materiales utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con sistemas vivos (células, tejidos, órganos y fluidos corporales) o que contienen una molécula con actividad biológica, estos deben de ser inocuos para el organismo. Son clasificados de acuerdo a su origen en sintéticos o artificiales, que incluyen a los metales, cerámicas y polímeros, otros son los biomateriales de origen natural o biológico como proteínas (colágeno o elastina) y polisacáridos.

La aplicación de los biomateriales ha sido útil en las especialidades médicas y farmacológicas, en cirugía reparadora y plástica, medicina regenerativa, administración de fármacos, diálisis, liberación de factores de crecimiento o incluso liberación de células. También se han desarrollado dispositivos de diagnóstico y pronóstico clínico en base a sensores o material biológico como el análisis genético [2].

La tendencia de la aplicación de los biomateriales se centra en la actualidad principalmente en:

- Generación de matrices para medicina generativa. Deben de ser biocompatibles y a la vez funcionales, deben además promover la regeneración celular de forma diferenciada.
- Sistemas de liberación controlada. Consiste en la encapsulación o gelificación de moléculas o células con actividad terapéutica, se aplica también para micro y nanopartículas.

- Sistemas de cultivo y validación. Considera los soportes para cultivo celular o tisular para la fabricación de material de ingeniería de tejidos.

1.1.1 Propiedades principales de los biomateriales

Todo aquel material destinado a la fabricación de biomateriales debe de reunir diversas propiedades biológicas, fisicoquímicas y mecánicas específicas que le permitan interactuar con el entorno fisiológico (Figura 2).

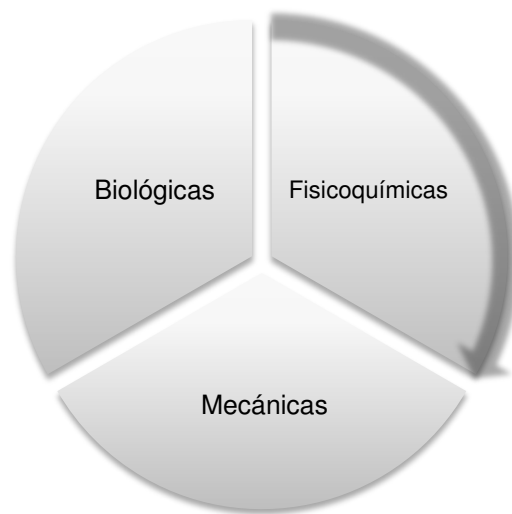


Figura 2. Propiedades principales de los biomateriales.

Biológicas

Biocompatibles y biológicamente inertes. No deben de provocar reacciones adversas que les limiten alcanzar el efecto deseado. Es por eso que no deben de ser citotóxicos, deben ser compatibles químicamente con soluciones acuosas y condiciones fisiológicas [1].

Fisicoquímicas

La cristalinidad, el comportamiento térmico-mecánico y la resistencia a la degradación química son algunas de sus propiedades que le permitirá al biomaterial asegurar el mantenimiento de su estructura una vez que sea colocado.

Mecánicas

Los biomateriales también deben poseer propiedades mecánicas que le aporten rigidez, porosidad e interconectividad adecuadas, superficie específica y buena permeabilidad, lo cual le permitirá una compatibilidad mayor y una mejor interacción con el entorno fisiológico [3].

1.2 MATERIALES CERÁMICOS

Los materiales cerámicos constituyen uno de los elementos principales para la fabricación de dispositivos que interactúan con los sistemas biológicos, estos tienen aplicaciones en diversas especialidades de la medicina.

Los primeros materiales cerámicos utilizados en aplicaciones médicas, fueron la alúmina y la zirconia (Figura 3), estas son prototipos de cerámicas “inertes”, por lo que fueron ampliamente utilizadas como implantes [2]. El inconveniente de estos materiales era que se sintetizaban a temperaturas muy elevadas, lo que limitaba la incorporación de fármacos. Actualmente los materiales cerámicos se sintetizan por la técnica sol-gel, la cual se lleva a cabo a bajas temperaturas y permite la preparación de materiales de calidad con alta pureza, homogeneidad y con un alto control en el tamaño de partícula, las matrices más frecuentemente utilizadas en la

actualidad están fabricadas a base de dióxido de silicio (SiO_2), dióxido de titanio (TiO_2), y óxido de aluminio (Al_2O_3) [4].

Otros materiales cerámicos no menos utilizados son el óxido de zirconio (ZrO_2), sulfato de calcio (CaSO_4), fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), vidrios bioactivos y vidrios cerámicos. Se clasifican como bioinertes al Al_2O_3 , ZrO_2 y TiO_2 , y como bioactivos cuando permiten una respuesta biológica específica en su interface, permitiendo así la formación de enlaces entre el tejido y el mismo material. Estos biomateriales se emplean en prótesis ortopédicas, implantes dentales, cirugía maxilofacial o como cementos óseos para rellenos de huesos[5].

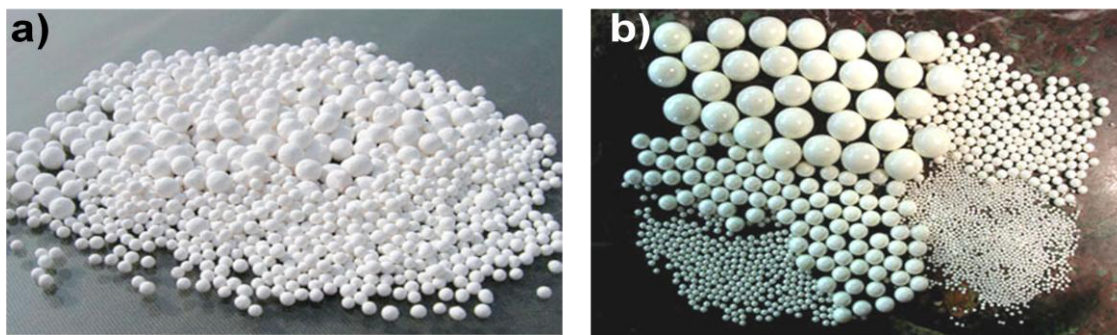


Figura 3. a) Alúmina y b) Zirconia, primeros materiales cerámicos utilizados en aplicaciones médicas.

Gracias a la excelente bioactividad de los vidrios sol-gel, su campo de aplicación se ha incrementado mediante la preparación de matrices mixtas, que son materiales cerámicos funcionalizados con compuestos orgánicos, en los que los vidrios son los elementos inductores de bioactividad [6]. Por otro lado las matrices cerámicas ofrecen la ventaja de tener una textura con una superficie específica y porosidad que proporcionan facilidad tanto para la incorporación como para la

liberación de fármacos. Dependiendo de las condiciones de síntesis y procedimientos adecuados existirán variaciones en estos aspectos.

Se considera que cualquiera de las cerámicas que están constituidas por numerosos poros con un tamaño adecuado dependiendo de las dimensiones del fármaco son buenas alternativas como sistemas de liberación [2].

Existe una diversidad de fármacos que pueden llegar a ser incorporados en matrices cerámicas de composición química diferente y no solo fármacos, sino también sustancias que favorezcan a una cinética de liberación o formación de tejidos (Figura 4); esto estará determinado dependiendo del implante que se trate y la patología que presente el paciente [2].

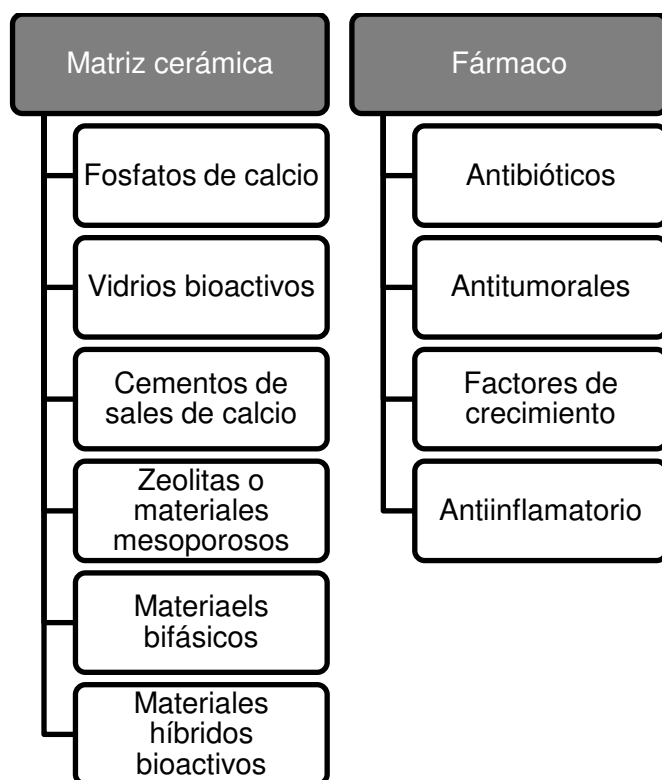


Figura 4. Matrices cerámicas para liberación de fármacos.

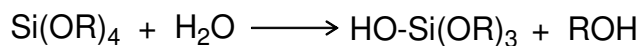
1.2.1 Técnica sol-gel para la síntesis de materiales cerámicos

La técnica sol-gel es considerada en la actualidad de gran utilidad para llevar a cabo la elaboración de materiales cerámicos y vidrios de alta pureza, otorgándoles homogeneidad y propiedades texturales, tales como el área superficial específica y la porosidad.

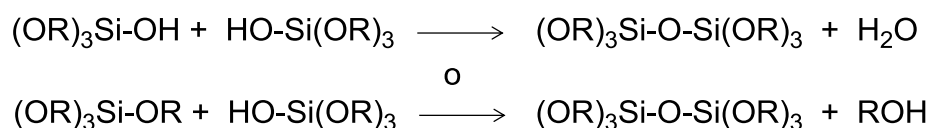
Otra característica importante es que permite sintetizar materiales híbridos orgánico-inorgánico, pues las condiciones de temperatura durante la síntesis permiten que se conserve la integridad del polímero orgánico [1]. En el caso de los fármacos hace posible su incorporación en la matriz ya que estos no se verán afectados por las condiciones de síntesis.

Esta técnica consiste principalmente en la preparación de un sistema coloidal (sol), el cual se desarrolla hasta convertirse en un sólido impregnado en una suspensión coloidal llamado gel [1].

Un sol puede prepararse utilizando compuestos orgánicos o inorgánicos y puede ser parte de partículas de óxidos o cúmulos de polímeros. Los precursores utilizados en la preparación de un coloide pueden estar constituidos de un elemento metálico o metaloide rodeado de varios ligandos. Por ejemplo, el precursor de sílice (SiO_2) es el tetraetil-ortosilicato TEOS ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$). Este precursor reacciona muy rápido con el agua, lo que favorece a la reacción de hidrólisis:



R representa el grupo alquil, por lo que –OR es un grupo alcoxi y ROH es un alcohol (dependiendo de la cantidad de agua la reacción puede concluirse). Todos los grupos OR son reemplazados por OH o pueden quedar parcialmente hidrolizados. Cuando se da la hidrólisis parcial las partículas se unen mediante reacciones de condensación:

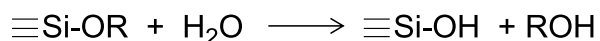


Estas dos últimas reacciones pueden continuar hasta llegar a formar grandes moléculas mediante procesos de polimerización. La estructura del polímero se determinará gracias a las reacciones de hidrólisis y condensación.

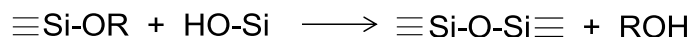
Durante el envejecimiento del gel las propiedades y su estructura se definirán. Cabe resaltar que las reacciones de gelación y polimerización continúan después de alcanzar el punto de gelado, produciendo fortalecimiento, endurecimiento y contracción de la red polimérica. El proceso de secado es de suma importancia, un secado óptimo favorece la formación de una estructura sólida “esqueleto”.

Generalmente los geles de sílice se sintetizan partiendo de la hidrólisis de monómeros de precursores de alcóxidos tetrafuncionales, utilizando como catalizador un ácido mineral o una base. Las siguientes reacciones son las más características:

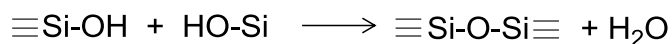
- Hidrólisis



- Condensación del alcohol



- Condensación del agua



Durante la hidrólisis los grupos alcóxidos son reemplazados por grupos OH, simultáneamente en las reacciones de condensación se producen uniones silanol más los productos de alcohol o agua. El agua y los alcoxisilanos son inmiscibles por lo que es recomendable utilizar un solvente que pueda controlar la concentración de sílice y agua en una sola fase, así como la cinética de reacción [7].

1.2.2 Materiales cerámicos como sistema de liberación prolongada para fármacos

Investigaciones actuales se han centrado en mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, dándole mayor preferencia a la liberación controlada, prolongada y biocompatibilidad de fármacos. Se busca en estos sistemas de liberación una mayor eficacia, una entrega específica en el sitio blanco y una protección contra la degradación enzimática [8].

Nuevas técnicas de administración a base de compuestos cerámicos están dirigidas a conseguir una liberación prolongada que permita conservar las concentraciones de fármaco adecuadas en el organismo y a la vez mantener fuera de los límites de ineficacia y de toxicidad en el tiempo que estos sean

administrados. Matrices a base de polímeros orgánicos, materiales híbridos orgánico-inorgánicos, vidrios y cerámicas han sido utilizadas para tales aplicaciones. Los materiales mesoporosos con estructuras de poros perfectamente regulares, representan una de las mayores contribuciones en este campo [2].

El uso de materiales porosos, en especial de sílice, como entrega controlada y como medio de estabilización de fármacos fue propuesto por primera vez en 1983, pero hasta 1988 Böttcher logró obtenerlos por la técnica sol-gel, posteriormente en el 2001 se llevaron a cabo las primeras aplicaciones industriales de la sílice obtenidas por sol-gel para liberación controlada de fármacos. Se elaboraron microcápsulas de sílice para incorporar avobenzona, filtro UV (Eusolex Perlas UV) [9].

Gracias a la estructura y propiedades fisicoquímicas de la sílice (Figura 5), ésta se puede utilizar para la encapsulación y liberación controlada de moléculas hidrófilas e hidrófobas. Ofrece resistencia mecánica, estabilidad química y física, biocompatibilidad y una naturaleza benigna con el medio ambiente [9].

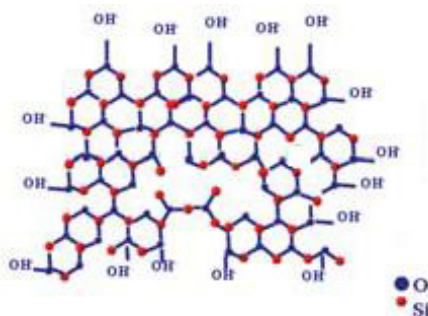


Figura 5. Estructura mesoporosa del óxido de silicio "sílice".

1.3 LIBERACIÓN PROLONGADA

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) define a los sistemas de liberación prolongada como: “una forma que permite al menos una reducción a la mitad en la frecuencia de administración respecto de las formas farmacéuticas convencionales” [10]. De esta manera se espera una disminución en la velocidad de liberación del fármaco y así alcanzar y mantener la biodisponibilidad requerida para lograr el efecto deseado.

La formulación de un sistema de liberación prolongada requiere que el fármaco pueda ser encapsulado, incorporado o mezclado con una sustancia transportadora. De esta manera el fármaco es vehiculado y liberado sistemáticamente a concentraciones terapéuticas.

Algunas de las ventajas que implican estos sistemas de liberación se puntualizan a continuación:

- Disminución de efectos adversos y tóxicos.
- Reducción en la frecuencia de administración.
- Posible mejora en la selectividad de la actividad farmacológica.
- Otorgan al paciente una comodidad mayor en el tratamiento, de esta manera se facilita el cumplimiento por parte de ellos.
- Alcanza adecuados niveles de concentración plasmáticos.

Se debe mencionar que estos sistemas también conllevan algunas desventajas, entre las que se encuentran las siguientes:

- Liberación excesiva de la dosis del fármaco de forma inmediata.
- Posible acumulación del fármaco.
- No se puede ajustar la dosis una vez que fue administrado[11].

Se ha demostrado que la cerámica a base de SiO_2 obtenida por la técnica sol-gel, es un material biocompatible y biorreabsorbible, por lo que tiene una aplicación potencial en el desarrollo de implantes o matrices inyectables para la liberación controlada de agentes biológicamente activos en los tejidos vivos [12]. Por lo cual, el uso de SiO_2 ha presentado un mayor interés de investigación en los campos de la biomedicina y la biotecnología. La conformación estructural de su matriz ha permitido la incorporación de diferentes moléculas, tales como biosensores y biomarcadores; se ha considerado también como vehículo ideal de fármacos, proteínas y genes, los cuales pueden efectuar su acción en los sitios diana de manera eficiente [2].

En particular, para aplicaciones de liberación controlada o prolongada de fármacos, la sílice es capaz de almacenarlos y liberarlos gradualmente; diversos fármacos tales como, analgésicos, antidiabéticos, antihipertensivos, antibióticos y anticancerígenos han sido incorporados en ella con este propósito. Además, las nanopartículas de sílice se han utilizado para mejorar la biocompatibilidad de algunos sistemas de administración de fármacos antineoplásicos [12].

1.3.1 Efecto en la eficacia terapéutica

Un sistema de liberación prolongada debe ser capaz de mantener la concentración terapéutica del fármaco en sangre, mostrar una mejoría en la duración de la

actividad de principios activos con vida media corta, debe eliminar o reducir los efectos secundarios y por último optimizar y mejorar el cumplimiento por parte del paciente.

Para poder obtener estos beneficios con el sistema de liberación prolongada se requiere considerar factores como las propiedades químicas y físicas del fármaco, la vía de administración, la naturaleza del vehículo de entrega y la biocompatibilidad [13].

La eficacia terapéutica de los medicamentos depende directamente de la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica y está disponible para ejercer el efecto deseado “biodisponibilidad”. Los dos factores principales que influyen en la biodisponibilidad son la solubilidad y la permeabilidad del fármaco, otros elementos importantes son la estabilidad química, la velocidad de disolución, la pureza, el comportamiento de compactación de cristal, la absorción de humedad y el grado de cristalinidad. La investigación en tecnología farmacéutica incluye la realización de modificaciones para mejorar la biodisponibilidad sin afectar la actividad farmacológica, entre dichas modificaciones se encuentran el uso de solvatos, hidratos, sales, co-cristales y sólidos amorfos, estos últimos han sido los preferidos para desarrollar nuevas formas de liberación[14].

1.4 TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica, causada por un microorganismo del género *Mycobacterium*, principalmente por el *M. tuberculosis*; esta puede atacar cualquier parte del cuerpo como el hueso, el sistema renal,

sistema genital o sistema nervioso central (meningitis), pero los pulmones son los órganos más vulnerables, se estima que cerca del 80% de las infecciones micobacterianas son consideradas TB pulmonar. Los pacientes diagnosticados con VIH (Virus de inmunodeficiencia humana) positivo presentan mayor riesgo de desarrollar una progresión rápida de esta infección. *Mycobacterium* puede extenderse a través del sistema respiratorio y causar TB extrapulmonar [15].

TB se considera la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida), causada por un agente infeccioso. En el transcurso de los años, esta enfermedad ha repercutido notoriamente en la sociedad, a pesar de que en 2012, la tasa mundial de mortalidad de la TB se había reducido en un 45%, se registraron 8.6 millones de nuevos casos y 1.3 millones murieron por esta causa. En este mismo año la farmacorresistencia y la vigilancia continua de los casos de TB notificados indicaron que el 3.6% de los nuevos casos de TB y el 20% de los pacientes de TB tratados con anterioridad habían desarrollado Tuberculosis-multirresistente (TB-MR). Los mayores niveles de TB-MR se encuentran en Europa Oriental y Asia Central [16].

El tratamiento convencional implica la administración sistémica de fármacos antituberculosos a través de la vía oral [17]. El uso de estos medicamentos puede desencadenar severos efectos secundarios como la hipopotasemia, efectos tóxicos renales, neutropenia y trastornos gastrointestinales, entre otros [15]. Además, debido a que los regímenes terapéuticos son prolongados, teniendo como mínimo una duración de seis a nueve meses, se dificulta conseguir una adecuada adhesión a la terapia por parte del paciente.

Se han considerado diversas medidas que han resultado más eficaces para el control de la endemia tuberculosa, el diagnóstico prematuro, la adecuada prescripción y sobre todo el cumplimiento del tratamiento. Este último es el más importante, sin embargo, resulta crucial la detección oportuna de los casos de resistencia a fármacos antituberculosos, en especial a los de primera línea para lograr el efecto terapéutico deseado [18].

De acuerdo al nivel de resistencia de la cepa a los fármacos, la OMS establece la siguiente clasificación:

- a) Monorresistencia confirmada: TB en pacientes cuyos aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* en pruebas *in vitro* resulten resistentes a fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol o estreptomina.
- b) Polirresistencia confirmada: TB en la que la micobacteria presente resistencia a más de un fármaco antituberculoso de primera línea, siempre y cuando sea diferente de la combinación de isoniazida y rifampicina.
- c) Tuberculosis multirresistente (TB-MDR) confirmada: Tuberculosis con resistencia bacteriana al menos a isoniazida y rifampicina.
- d) Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR): TB en la que se presente resistencia aparte de isoniazida y rifampicina, a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres fármacos inyectables de segunda línea: amikacina, kanamicina y capreomicina [16].

1.4.1 Tuberculosis multirresistente

La tuberculosis multirresistente, al generar resistencia hacia dos de los fármacos de primera línea conlleva al fracaso inevitable del tratamiento [19].

La resistencia a los medicamentos se da principalmente por el uso inadecuado de los antibióticos al tratar con ellos a pacientes afectados por tuberculosis farmacosensible [16], esto ha propiciado la administración de regímenes terapéuticos incorrectos por parte de los agentes de salud y ha conducido también a que el paciente no consiga culminar con el tratamiento. Regularmente la farmacorresistencia surge generalmente en zonas donde no llegan programas de apoyo para tratar a la tuberculosis.

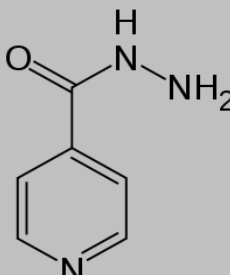
En el 2011 se reportaron cerca de 630,000 casos de tuberculosis multirresistente, entre los 12 millones de tuberculosis registrados a escala mundial, adicionalmente se han detectado casos de tuberculosis extremadamente resistente o ultrarresistente en 84 países [16].

1.5 ISONIAZIDA

1.5.1 Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas

La hidracida de ácido isonicotínico (isoniazida, INH) es un polvo cristalino incoloro o blanco, se descompone si se expone al aire y a la luz. Es muy soluble en agua, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en cloroformo y éter dietílico. Es un agente tuberculostático, tiene la propiedad de propiciar la formación de quelatos metálicos con iones bivalentes [20]. En la tabla 1 se resumen sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas:

Tabla 1. Propiedades de INH: a)Fisicoquímicas, b)Biofarmacéuticas [10, 21].**a) Propiedades Fisicoquímicas**

Fórmula molecular: $C_6H_7N_3O$	
Masa molar: 137.139 g/mol	
Punto de fusión	
UV max.	266 nm (agua); 265 nm (HCl), 254 nm (HPLC).
pKa	1.8, 3.5, 9.5.

b) Propiedades biofarmacéuticas

Dosis	300 mg/día
DL ₅₀	151 i.p. 149 i.v.
Unión a proteínas	10-15 %

1.5.2 Mecanismo de acción

El fármaco isoniazida inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos de la membrana de la micobacteria (Figura 6). Se activa por acción de la enzima catalasa-peroxidasa, de esta manera inhibe la conversión de ácidos insaturados a saturados en la síntesis de ácidos micólicos, los cuales son importantes constituyentes de la pared celular del bacilo. También se le atribuyen propiedades fungicidas cuando se encuentra en complejos con ligandos mixtos de iones metálicos[20].

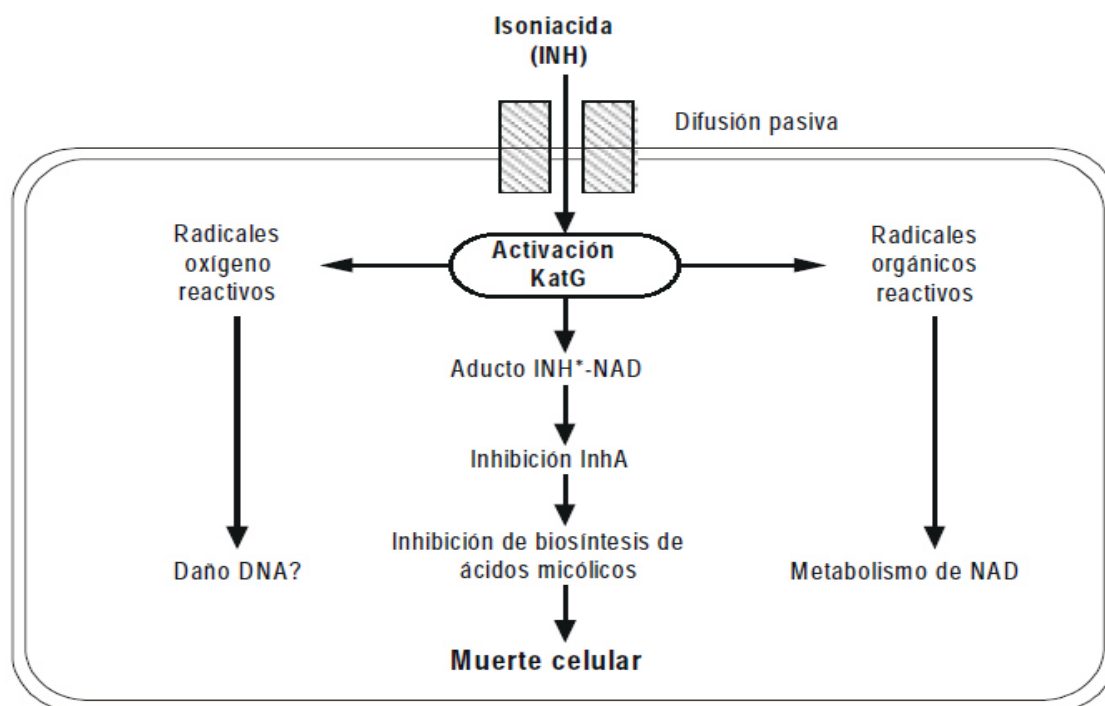


Figura 6. Mecanismo de acción de INH [22].

1.5.3 Farmacocinética/Farmacodinamia

Absorción: Rápida y completamente en el intestino, ésta se puede retrasar si se administra junto con los alimentos.

Distribución: Se difunde en todos los tejidos y fluidos corporales, incluso logra penetrar al líquido cefalorraquídeo y al material gaseoso de la lesión causada por el bacilo.

Metabolismo: Está determinado por el fenotipo de acetilación, aunque también por hidrólisis; vida media: acetiladores rápidos: 30-100 minutos, acetiladores lentos: 2-5 horas.

Excreción: La mayor parte es excretada por orina (75%-95%), el resto a través de heces y saliva.

Efectos adversos: en sistema cardiovascular puede llegar a causar hipertensión, palpitación, taquicardia y vasculitis, entre las posibles reacciones adversas a nivel de sistema nervioso central se reportan depresión, fiebre y psicosis. También puede llegar a causar daño hepático, anorexia, náusea, vómito e irritación gástrica [23].

1.5.4 Formas comerciales

- Isotamine®; PMS-Isoniazid [23].
- Cemidón B6® comprimidos y ampolletas [24].

En combinación con otros fármacos tuberculostáticos

- Rifater®, Rifampicina (150 mg) y Pirazinamida (400mg); Isoniazida (75 mg) [25].
- Rifinah®, Rimactazid®: Rifampicina (300 mg); Isoniazida (150 mg) [24].
- Tiosbrif®: Rifampicina (600 mg) y Piridoxina (50 mg); Isoniazida (300 mg) [24].
- Rifater®: Pirazinamida (300 mg) y Rifampicina (120 mg); Isoniazida (50 mg) [24].
- Rimcure®: Pirazinamida (400 mg) y Rifampicina (165 mg); Isoniazida (75 mg) [24].
- Rimstar®: Pirazinamida (400mg), Rifampicina (150 mg) y Etambutol (275 mg); Isoniazida (75 mg) [24].

1.5.5 Uso terapéutico de la isoniazida

La isoniazida es uno de los fármacos de primera línea más eficaces para tratar la TB [26], la cual representa en la actualidad un problema sanitario a escala mundial. Además de la isoniazida, entre los fármacos de primera línea se encuentran rifampicina, pirazinamida y etambutol, los cuales se emplean en algunos casos como terapia triple por períodos prolongados que van desde seis hasta 24 meses; la complejidad y la larga duración del tratamiento, así como la falta de apoyo y supervisión de un agente sanitario que facilite el cumplimiento del paciente frecuentemente conducen al desarrollo de resistencia a estos antibióticos, lo que requiere de la utilización de fármacos de segunda línea, que

incluyen aminoglucósidos, antibióticos, cicloserina, etionamida y fluoroquinolonas (Tabla 2) [15].

Tabla 2. Fármacos de primera y segunda línea para tratar TB [15].

	Fármaco	Vía de administración	Dosis recomendada
Fármacos de primera línea	Isoniazida	Oral, I.M. o I.V.	5 mg/kg, al día, la dosis diaria máxima es 300 mg
	Rifampicina	Oral o I.V	10 mg/kg diarios, o 3 veces por semana, con un máximo de 600 mg
	Pirazinamida	Oral	25 mg/kg diariamente
	Etambutol	Oral	15 mg/kg diariamente
	Estreptomina	I.M. o I.V.	15 mg/kg al día, o 3 veces a la semana; dosis máxima diaria es de 1 g
Fármacos de segunda línea	Etionamida	Oral	15-20 mg/kg/día, una o dos veces/día, la dosis diaria máxima es de 1 g
	Ácido p-aminosalicílico	Oral	4 g, 2-3 veces/día, la dosis diaria máxima es de 16 g
	Cicloserina	Oral	10-15 mg/kg, diariamente, la dosis diaria máxima es de 1 g
	Kanamicina A	I.M. o I.V.	15 mg /kg, diariamente, la dosis diaria máxima es de 1 g
	Amikacina	I.M. o I.V.	15 mg/kg, diariamente, la dosis diaria máxima es de 1 g
	Moxifloxacino	Oral o I.V	400 mg/día
	Levofloxacino	Oral o I.V.	500-1000 mg/día, dosis diaria y / o máxima es de 1 g
	Clofazimina	Oral	200 mg al día
	Linezolid	Oral o I.V.	600 mg una vez al día

La evolución de la resistencia de la micobacteria ha propiciado la búsqueda de estrategias terapéuticas individuales y generales dirigidas a la prevención, el tratamiento y control de la tuberculosis multifarmacorresistente.

Un gran número de medicamentos se han diseñado para reducir la frecuencia de dosificación mediante la modificación de la velocidad de absorción de diferentes fármacos, aun así el problema del incumplimiento terapéutico no se ha podido erradicar [27]. El hecho de usar un biomaterial que permita la liberación de la dosificación adecuada por un tiempo prolongado y que de esta manera el paciente pueda cumplir eficientemente su tratamiento se ha convertido en un tema de gran interés para diferentes grupos de investigadores [28].

Con el propósito de reducir el desarrollo de multifarmacorresistencia se hace necesaria la elaboración de nuevas alternativas para las formas de dosificación, las cuales permitan la liberación prolongada del fármaco y faciliten el cumplimiento terapéutico por parte del paciente. En el caso particular de la tuberculosis, debido a la larga duración del tratamiento, el desarrollo de un implante que libere isoniazida durante tiempo prolongado, representa una forma para disminuir el incumplimiento de la terapia, permitiendo mantener las concentraciones plasmáticas del fármaco en el rango terapéutico y evitando el desarrollo de resistencia por el *Mycobacterium tuberculosis*.

1.6 PERMEABILIDAD DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES

El uso de membranas artificiales que imiten las membranas biológicas ofrece un método que permite establecer el potencial de absorción de un fármaco, además de que estos ensayos son altamente reproducibles, rápidos y tienen un bajo costo. Sin embargo, tienen la desventaja de estar en ausencia de enzimas y de transportadores, además de que la totalidad de estos métodos no siempre están conformados por bicapas lipídicas. De cualquier manera, las membranas artificiales resultan de gran utilidad, pues la mayoría de las moléculas activas son absorbidas principalmente mediante transporte pasivo. El uso de ellas para imitar las membranas biológicas, otorga una alternativa para evaluar el potencial de absorción de un fármaco y establecer relaciones existentes entre la estructura química de los fármacos y su lipofilicidad [29]



Figura 7. Celdas de difusión de Franz.

El ensayo de permeabilidad utilizando celdas de de difusión de Franz (Figura 7) es uno de los métodos más aplicados para ensayos de permeabilidad en membranas artificiales. Esta técnica se caracteriza por ser altamente reproducible y de bajo costo cuando se utiliza junto con una membrana artificial bio-mimética.

La técnica es simple, rápida y sobre todo útil para predecir la absorción de fármacos, la temperatura puede ser controlada y es posible mantener las soluciones donadora y receptora bajo agitación continua [30].

1.6.1 Paso de fármacos a través de membranas celulares

La membrana celular funciona como una barrera semipermeable, siendo altamente selectiva, controla el paso de moléculas ya sea hacia fuera o dentro de ella. Mantiene las concentraciones de iones entre el interior y el exterior de la célula. La membrana plasmática también actúa como un sensor de señales externas, permitiendo a la célula alterar su comportamiento en respuesta a estímulos de su entorno.

Es una estructura anfipática conformada por una bicapa de moléculas lipídicas entremezcladas con proteínas. Los fosfolípidos, glicolípidos y el colesterol son los lípidos principales que la componen. En la mayoría de las células los fosfolípidos son los que se encuentran en mayor proporción, están conformados por cabezas polares hidrofílicas y colas apolares hidrofóbicas, este arreglo limita la difusión de solutos polares a través de la membrana, pero permite la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas.

Las proteínas que conforman la bicapa fosfolipídica son las responsables de la mayor parte de las funciones desempeñadas por la membrana celular, permiten la permeabilidad específica selectiva de moléculas mediante mecanismos de transporte pasivo y activo, así como el transporte de pequeñas moléculas hidrosolubles a través de ella [31].

Cuando el transporte celular no requiere energía se da por transporte pasivo, este a la vez tiene tres posibilidades: difusión simple, a través de los poros de la membrana (transcelular o paracelular); difusión activa, como resultado de una adecuada liposolubilidad, y difusión facilitada, como resultado de una liposolubilidad adquirida al unirse al material de la membrana (proteínas). Por el contrario cuando el movimiento de sustancias requiere de un gradiente químico o eléctrico sucede el transporte activo [32].

Considerando que el transporte de un fármaco a través de la membrana ocurre por difusión pasiva, su predicción teórica puede llevarse a cabo basándose en la primera ley de Fick, así mismo se hace una adecuación para poder predecir la absorción, resultando la siguiente ecuación:

$$F_{abs} = (dosis^{-1}) \int_0^{t_{res}} \cdot \int_A \cdot P_{eff} \cdot C \cdot dA \cdot dt$$

Donde t_{res} es el tiempo de residencia del fármaco, A es el área de la membrana, P_{eff} es la permeabilidad efectiva a través de la membrana, C es la concentración del fármaco y t es el tiempo.

Las reglas para la difusión simple a través de la membrana son ampliamente combinadas con la ecuación matemática de la Ley de Fick, agregando el factor del gradiente de concentración. Estas reglas son las siguientes:

- La velocidad de difusión depende de la capacidad de la molécula que difunde, de disolverse en la capa lipídica de la membrana.
- La velocidad de difusión a través de una membrana es directamente proporcional a la superficie de la membrana.
- La velocidad de difusión a través de una membrana es inversamente proporcional al espesor de la misma [33].

1.7 ANTECEDENTES

Después de la segunda guerra mundial y hasta principios de los años 60, había pocos pioneros que utilizaran metales para la fabricación de implantes con aplicación médica, fue hasta los años 70 que surgió la necesidad de buscar nuevos materiales para este fin. Estos materiales se crearon para uso específico en medicina, como polímeros biodegradables y cerámicas activas [34].

Desde el descubrimiento, por parte del Prof. L. Hench en 1971, de la capacidad de ciertos vidrios basados en SiO_2 para unirse a los tejidos duros a través de un enlace mecánicamente fuerte, el desarrollo y aplicación clínica de los vidrios bioactivos no ha dejado de crecer en los últimos años [35].

La incorporación de la química sol-gel (1991) al campo de los materiales cerámicos abrió todo un panorama de posibilidades, creando una nueva generación de vidrios bioactivos, mejorando potencialmente el desarrollo de implantes[2]. Este proceso, que utiliza temperaturas mucho más bajas que el método de fusión, permite obtener vidrios de mayor pureza y homogeneidad, expandir el rango de composiciones bioactivas y mejorar las propiedades texturales (superficie específica y porosidad).

Vallet-Regí con su grupo de investigación en el 2001, propuso el material mesoporoso MCM-41, un material que resulta de la incorporación de bromuro de cetiltrimetilamonio durante la síntesis de la sílice vía sol-gel, para aplicación en el ámbito biomédico, como sistema de liberación controlada de fármacos [36].

Zhu y colaboradores en el 2005 incorporaron el Ibuprofeno en MCM-41, demostrando que este material retardaba la liberación del principio activo hasta tres veces en relación al de liberación inmediata [37].

La incorporación de antibióticos en la estructura porosa de los vidrios mesoporosos bioactivos se propuso por primera vez por Xia y Chang. Ellos utilizaron la técnica convencional de impregnación del fármaco, poniendo en contacto el vidrio mesoporoso bioactivo de composición SiO_2 , CaO y P_2O_5 con una disolución concentrada de sulfato de gentamicina [37].

Peterson y colaboradores realizaron pruebas para comparar la liberación controlada a través de implantes de titanio sintetizados por la técnica sol-gel, se consideraron dos fármacos anticonvulsivos, ácido valproico y fenitoína sódica. Ellos observaron que cuando la concentración del fármaco se incrementa, la liberación inicial disminuye. [38]

Timo Lebold en el 2009 junto con un grupo de investigadores utilizaron como vehículo sílice mesoporosa con tamaño nanométrico, para la liberación de doxorubicina. La cinética de liberación la determinaron utilizando células *in vivo*, se demostró la reproducibilidad de este sistema para el suministro de fármacos. El estudio concluyó que el tamaño del poro y las características que presenta la superficie son los factores principales que determinan la liberación del fármaco [39].

Yunchang Xin y colaboradores en el 2009 desarrollaron un sistema de liberación prolongada capaz de estimular la formación de hueso, este implante lo elaboraron

a base de nanotubos de óxido de titanio con liberación de estroncio. Experimentos *in vitro* revelaron que este implante posee buena biocompatibilidad, por lo que se consideró un candidato ideal para implantes óseos. También demostraron que se pueden incorporar otros elementos biológicamente útiles, tales como Mg y Zn [40].

López y colaboradores llevaron a cabo la liberación de hidrocortisona impregnada en cuatro compuestos mesoporosos de SiO_2 funcionalizados con diversos aditivos. Su propósito fue estudiar el efecto del aditivo en el tamaño de poro del material y en la liberación del fármaco impregnado [28]. Este mismo grupo de investigadores, en el 2010, por medio de la técnica sol-gel elaboraron un implante a base de TiO_2 , en éste incorporaron ácido valpróico. Ellos estudiaron el efecto del agua en la formación del gel, concluyendo que afecta considerablemente las propiedades químicas y morfológicas del implante [41]. También incorporaron por la misma técnica dopamina en un implante a base de sílice, evaluando este dispositivo para la liberación controlada del fármaco [11]. Un año después incorporaron fenitoína (fármaco antiepiléptico) a través del método sol-gel. Sus estudios reflejaron que el perfil de liberación del fármaco fue dependiente de la morfología y propiedades superficiales de la matriz [42].

León Albarran y colaboradores en el 2011 encapsularon en sílice nanoestructurada y funcionalizada obtenida por la técnica sol-gel el IFC-305, un fármaco en investigación derivado de la adenosina, con el fin de utilizarlo como sistema de administración para el tratamiento de cáncer hepático. La síntesis la llevaron a cabo considerando diferentes relaciones molares de los precursores y

concentraciones del fármaco, ellos concluyeron que la liberación del fármaco no se afecta por las relaciones molares utilizadas [12].

Con respecto a investigaciones relacionadas con la incorporación de fármacos antituberculosos en biomateriales, así como también el estudio de liberación a través de estos, encontramos que L. Hurley y B.R. Andersen en 1998, realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo* de un sistema de liberación para isoniazida a través de un implante subcutáneo en un modelo animal; este fue elaborado a base de L-lactida y moldeado por compresión. Ellos midieron las tasas de liberación de isoniazida y la estabilidad estructural del implante en medio acuoso, para las pruebas *in vivo* determinaron los niveles del fármaco en suero y orina, determinando que el polímero conteniendo isoniazida fue estructuralmente estable en medio acuoso y que se logró la liberación del fármaco en un período de por lo menos 15 semanas [43].

Años más recientes Bullo Saifullah y colaboradores en el 2012 elaboraron una formulación de liberación sostenida para un medicamento antituberculoso. Utilizaron el fármaco ácido 4-amino salicílico (4-ASA), lo intercalaron en un nanocompuesto a base de capas de hidróxido de zinc a través de la reacción directa con la suspensión de óxido de zinc [44].

En base a estos antecedentes se demuestra la importancia de la incorporación de fármacos en materiales cerámicos para lograr su liberación prolongada, en formas de dosificación orales o a través de implantes; no obstante de que se han incorporado una gran cantidad de fármacos: analgésicos, antiinflamatorios,

anticonvulsivos, antiparkinsonianos, antibióticos y anticancerígenos, el campo de investigación continua siendo muy amplio, en especial para los antibióticos, ya que al ofrecer una forma de liberación prolongada se apoya el cumplimiento del régimen terapéutico por parte del paciente y se reduce el desarrollo de resistencia de las bacterias. En base a lo anterior se fundamenta el presente proyecto de investigación, la incorporación de isoniazida en un material cerámico elaborado vía sol-gel y la evaluación de sus características de liberación en condiciones fisiológicas.

2. HIPÓTESIS

El desarrollo de un biomaterial cerámico a base de SiO_2 , conteniendo isoniazida provee una alternativa de liberación prolongada en condiciones fisiológicas, con potencial aplicación en la elaboración de un implante.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características de liberación de la isoniazida incorporada en una matriz cerámica a diferentes condiciones fisiológicas *in vitro*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar vía sol-gel el biomaterial de SiO_2 conteniendo isoniazida a dos diferentes valores de pH y dos concentraciones de los precursores del polímero.
- Caracterizar el biomaterial sintetizado mediante técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas.
- Realizar pruebas de extracción para evaluar la incorporación de isoniazida del biomaterial.
- Evaluar *in vitro* las características de liberación de la isoniazida en solución a pH 7.1, el cual corresponde al pH del tejido muscular.
- Evaluar el efecto de la liberación de INH a partir de los biomateriales sobre la permeabilidad del fármaco a través de membranas artificiales.
- Cuantificar la isoniazida liberada a diferentes tiempos mediante HPLC.

4. METAS

- Desarrollar un biomaterial cerámico conteniendo isoniazida que en condiciones fisiológicas presente liberación prolongada.
- Obtener el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia en el tiempo establecido.
- Difundir los resultados de la investigación en Congresos Nacionales e Internacionales.
- Redactar un artículo para su publicación en una revista del *Citation Index*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se desarrolló en instalaciones de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y en la Universidad Nacional de Córdoba (UNC); se llevó a cabo en las siguientes etapas:

- Síntesis de los biomateriales por la técnica sol-gel. Laboratorio de Fotocatálisis, FCQ, UANL.
- Caracterización de los biomateriales por técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas. Laboratorios FCQ, UANL.
- Pruebas de extracción y liberación *in vitro*. Laboratorio de Biofarmacia, FCQ, UANL.
- Estudios de liberación a través de membranas. Laboratorio de Control de Calidad y Análisis Farmacéutico, FCQ, UNC.

5.1 Síntesis de los biomateriales

La síntesis de los biomateriales se llevó a cabo por la técnica sol-gel, la cual es una ruta que se utiliza principalmente para la preparación de óxidos metálicos. Esta técnica se basa en la polimerización inorgánica a partir de precursores moleculares, lo cual conduce a la formación de especies o coloides altamente condensados [45]. Para este caso es una ruta coloidal que facilita la síntesis de materiales cerámicos, en la que se incorporó la isoniazida en la etapa de formación de sol a gel.

Las soluciones iniciales para obtener los biomateriales se prepararon a partir de las cantidades estequiométricas de tetraetil ortosilicato-TEOS (98%, Aldrich ®), alcohol etílico (96.6%, DEQ®) y de agua nanopura ($18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Se determinó llevar a cabo cuatro diferentes condiciones (Tabla 3) de síntesis realizando variaciones en la relación TEOS/ Agua (1:6 y 1:8) y en el pH (3 y 5), se decidió incorporar el 20% de isoniazida (99%, Sigma-Aldrich ®).

Tabla 3. Condiciones de síntesis para los biomateriales sintetizados vía sol-gel.

Biomateriales	pH	Relación TEOS/Agua
B 5.1.8	5	1:8
B 5.1.6	5	1:6
B 3.1.8	3	1:8
B 3.1.6	3	1:6

La metodología que se utilizó para la síntesis de los biomateriales (Figura 8) comenzó con la mezcla de los precursores; el TEOS se añadió al etanol gota a

gota a gota bajo agitación magnética continua. Posterior a esto se ajustó el pH de la solución (3 o 5) con una solución de HCl (37.4%, CTR®) y se procedió a agregar gota a gota la solución de isoniazida preparada en una mezcla de agua-etanol, manteniendo agitación constante. Posteriormente toda la mezcla se sometió a reflujo a 70 °C durante dos horas. Una vez concluido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó gota a gota NH_4OH (30%, CTR®) para favorecer y agilizar la gelificación. Una vez obtenido el gel, se dejó envejecer a temperatura ambiente durante 24 horas, con el fin de que se diera la maduración antes del secado. Después se sometió a la etapa de secado a una temperatura de 65-70 °C y posterior a esto se homogeneizó. Finalmente el biomaterial se trató térmicamente a 160 °C por 5 horas con el fin de remover la mayor cantidad de los solventes utilizados durante la síntesis.

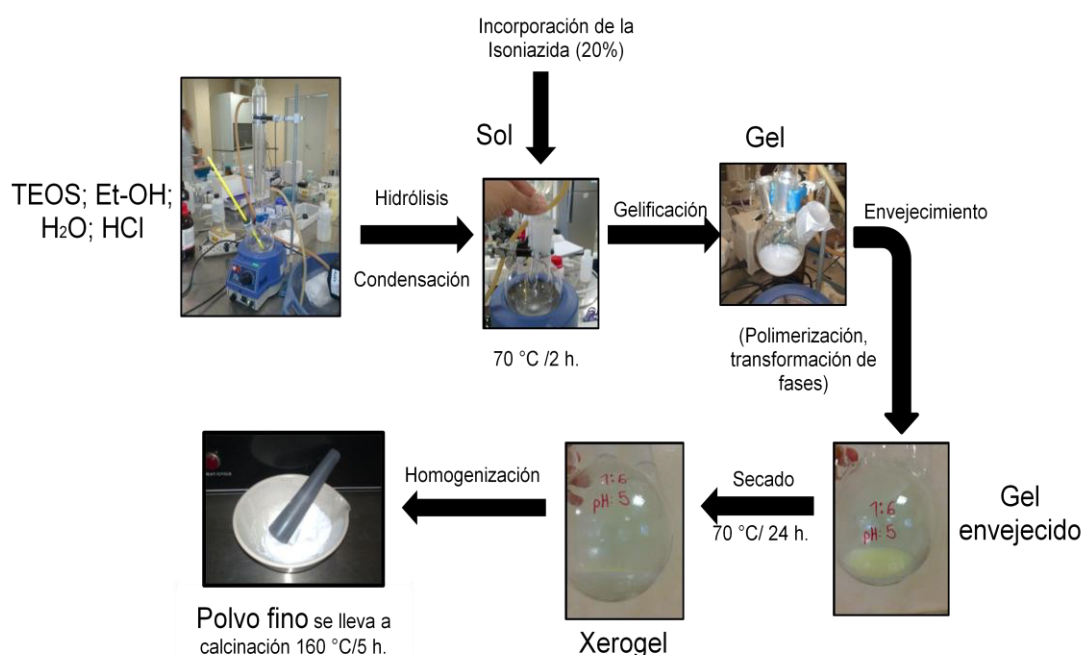


Figura 8. Esquema que incluye las diferentes etapas del proceso sol-gel para la síntesis del biomaterial e incorporación de la isoniazida.

5.2 Caracterización de los biomateriales

Los biomateriales calcinados, la sílice y la isoniazida se evaluaron por análisis térmico (ATG-ATD). Los biomateriales y la sílice fueron caracterizados por difracción de rayos-X (DRX), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), microscopia electrónica de barrido (MEB), espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDS), análisis textural: además de la determinación del área superficial (BET) y porosidad (BJH) a partir de la isoterma de adsorción de N₂.

5.2.1 Análisis térmico (ATG-ATD)

La isoniazida, las muestras en seco de los biomateriales y la sílice fueron evaluadas en el analizador térmico diferencial/termogravimétrico TA Instruments SDT 2960, las mediciones se realizaron en un rango de 10-800 °C, con atmósfera de aire y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

5.2.2 Difracción de rayos-X (DRX)

Los patrones de difracción para isoniazida y biomateriales se obtuvieron con el difractómetro de rayos X Siemens D-500. La intensidad de difracción se midió en un intervalo 2θ de 5° a 90°, con un tamaño de paso de 0.02°.

5.2.3 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los estudios se realizaron en el espectrofotómetro infrarrojo Spectrum one Perkin Elmer. El barrido espectral por ATR se realizó en un intervalo de 4000 a 650 cm⁻¹.

5.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS)

Para conocer la morfología de los biomateriales y de la sílice, las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido JSM-6701F, este instrumento está equipado con una sonda para EDS, el cual indicó la composición química de las muestras. Se utilizó cinta de carbono para fijar las muestras a excepción de la sílice que se fijó con una cinta de oro.

5.2.5 Análisis textural: BET-BHJ

Las isothermas de adsorción y desorción de Nitrógeno se obtuvieron usando el equipo Quantachrome Autosorb-1 AS-1C2. El área superficial se calculó por el método BET y el volumen de poro se determinó por el método de distribución de poro BJH a partir de las isothermas de adsorción. Antes de obtener las isothermas, las muestras fueron desgasificadas al vacío por 48 horas a 90 °C.

5.2.6 Análisis elemental

Las pruebas de análisis elemental se llevaron a cabo en el equipo de Análisis Elemental Perkin Elmer 2400, a una temperatura de combustión de 974 °C, de reducción 500°C, una temperatura del detector del horno de 82.1 °C y una presión de 172.7 mmHg.

5.3 Identificación y cuantificación de isoniazida por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia es una de las técnicas más adecuadas para el análisis y control de medicamentos de las Farmacopeas Oficiales, como la USP y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos [10], [21].

En este proyecto el estudio se llevó a cabo en el equipo HPLC Waters, con detección UV (Photodiode Array Detector) (Figura 9); en fase reversa, utilizando la columna SUPELCOLOSIL™ LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm). La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de Acetonitrilo (grado HPLC, J.T.Baker®) y Buffer de fosfatos en una relación 25:75. El buffer de fosfatos fue preparado con NaH₂PO₄ (99% Sigma-Aldrich®) 0.01 M y EDTA (99% Alfa Aesar®) 2 mM, ajustado a un pH 6 con NaOH 1M [46].



Figura 9. Equipo HPLC Waters, utilizado para la identificación y cuantificación de isoniazida (Laboratorio Biofarmacia, FCQ, UANL).

Para conocer la longitud de onda de máxima absorción de INH se registró el espectro de absorción UV-Vis en un espectrofotómetro (Perkin Elmer), encontrando que tiene un máximo de absorción a la longitud de onda de 264 nm. El volumen de inyección fue de 100 μl y la señal de isoniazida en el cromatograma se presentó a un tiempo de retención a los 3.45 minutos. (Figura 10).

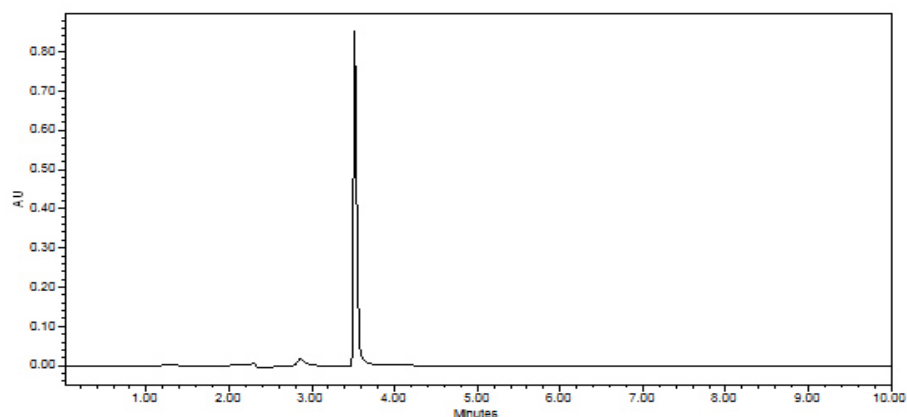


Figura 10. Cromatograma de isoniazida (estándar 15 ppm).

5.3.1 Curva de calibración

Una vez que se establecieron los parámetros para INH por HPLC, se procedió a realizar la curva de calibración. Se prepararon nueve estándares (Tabla 4) partiendo de una solución stock de 100 mg/L (100 ppm) de INH. Se hicieron las diluciones correspondientes aforando en una matraz de 10 ml con agua grado nanopura ($18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Tabla 4. Estándares preparados para la curva de calibración de INH.

Estándar	INH (mg/L)
1	0.3
2	0.5
3	0.7
4	1
5	5
6	10
7	15
8	20
9	30

Se llevaron a cabo las mediciones de los estándares por HPLC a la longitud de onda de 264 nm. La preparación de cada uno de los estándares se realizó por triplicado. La Figura 11 muestra la curva de calibración para INH, donde se puede observar que el intervalo de concentraciones establecido cumple con la Ley de Lambert-Beer, el coeficiente de correlación obtenido es de 0.9998, siendo considerablemente aceptable.

Para el análisis de los datos se utilizó el software Origin Versión 6.1, el sistema se calibró en un rango de presión entre 2500 y 3000 PSI.

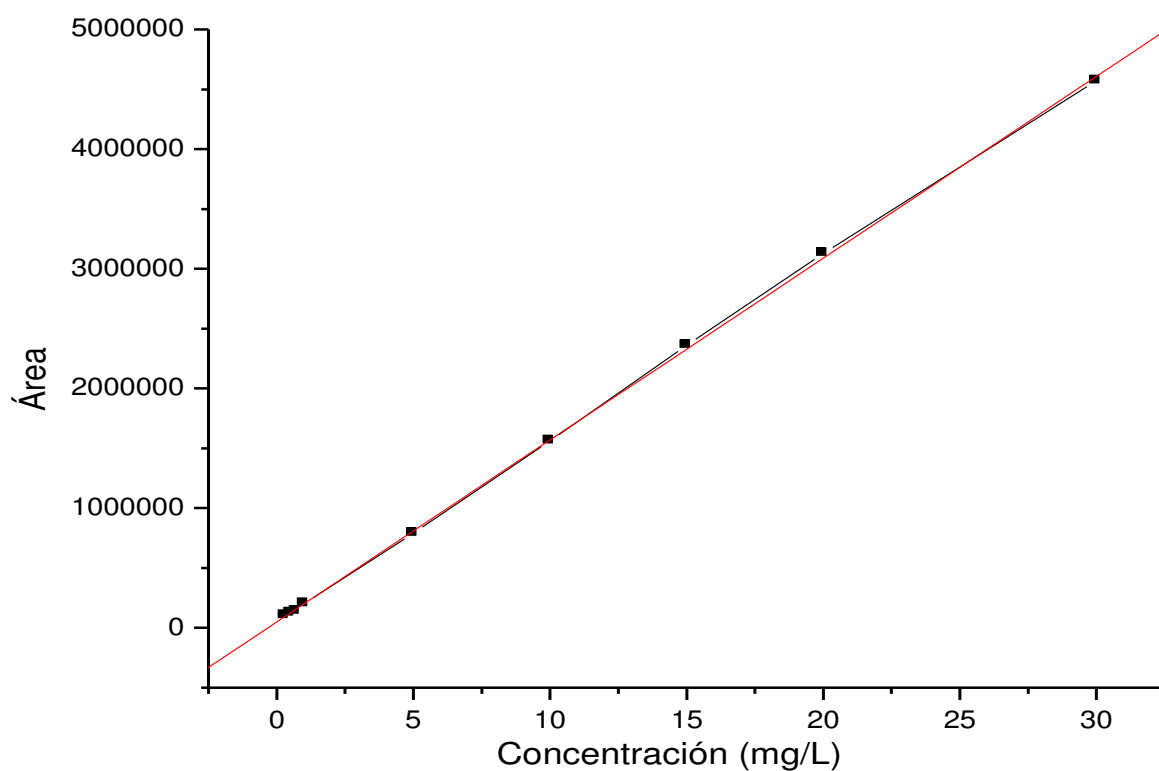


Figura 11. Curva de calibración para INH, obtenida por la preparación de nueve estándares, partiendo de un stock de isoniazida de 100 ppm.

5.4 Pruebas de Extracción

Para determinar el porcentaje de isoniazida incorporada en cada uno de los cuatro biomateriales sintetizados vía sol-gel, se llevaron a cabo pruebas de extracción. Las muestras fueron sometidas a agitación mecánica en el equipo Incubator-shaker LAB-LINE®.

Las condiciones de trabajo fueron establecidas con el fin de evaluar la máxima cantidad liberada del fármaco (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de extracción para INH a través de los biomateriales.

Condición	Solvente	Rpm	Temperatura °C
1	Buffer de fosfatos pH 7.1	325	45
2	Buffer de fosfatos pH 7.1	300	37.5

Se consideraron tiempos de extracción de 24 horas para cada una de las condiciones. Una vez que transcurrió el tiempo, se tomó una alícuota de cada muestra, se filtró con Millipore Millex-HN ® Nylon 0.45 μ , y después se colocaron directamente las muestras en un vial para ser inyectadas en HPLC, posteriormente se cuantificó el porcentaje de extracción de isoniazida.

5.5 Pruebas de liberación *in vitro*

Para evaluar los perfiles de liberación de isoniazida se llevaron a cabo pruebas *in vitro* utilizando el Disolutor Vankel, modelo VK700 (Figura 12). Se consideró el uso de canastillas, con el fin de simular mejor las condiciones y minimizar el golpeo hacia los biomateriales.

Una vez que fueron pesados los biomateriales se colocaron en cada una de las canastillas, previo a esto el medio de liberación ya había sido añadido a cada uno de los vasos y el equipo se había estabilizado. Las condiciones de trabajo fueron 100 rpm a una temperatura de 37.5 °C.

El medio de liberación utilizado fue un buffer de fosfatos preparado con NaH_2PO_4 (99% Sigma-Aldrich®) 0.01 M y EDTA (99% Alfa Aesar®) 2 mM, ajustado a un pH 7.1 con NaOH 1 M. Se consideró pH de 7.1 con el fin de simular las condiciones

que se encuentran a nivel de tejido muscular. Una vez preparado el medio se colocó en un baño de ultrasonido, para obtener un medio desgasificado (modelo Branson 2510) por 20 minutos.



Figura 12. Disolutor Vankel con canastilla.

El estudio se llevó a cabo en un lapso de 29 días y se tomó una alícuota de 1 ml por cada muestra, el estudio fue realizado por duplicado. En la siguiente tabla se muestran los tiempos que se consideraron para la toma de las muestras.

Tabla 6. Tiempos a los que fueron tomadas las alícuotas para las pruebas *in vitro* de liberación de INH.

Horas	0.3	0.6	1	2	3	4	5	6	24	48
	120	144	168	192	216	312	336	360	504	696

Las muestras fueron tratadas antes de ser inyectadas al HPLC, cada una de ellas fueron filtradas utilizando Millipore Millex-HN® Nylon 0.45 μ , posteriormente fueron aforadas con la fase móvil (ACN/PBS 25:75) en un matraz de 10 ml, enseguida se

tomó una alícuota de 1000 µl y se colocó en un vial para luego ser cuantificada por HPLC.

5.6 Estudios de permeabilidad de INH utilizando membranas artificiales a partir de los biomateriales como sistemas de liberación prolongada.

Para el estudio de liberación de isoniazida se utilizaron celdas de difusión Franz bicompartimentales (Figura 13) con un área de difusión activa de 1,44 cm². De esta manera se mimetizaron las propiedades lipofílicas de las membranas biológicas, se utilizaron membranas de éster de celulosa de 0.45 µm (Gamafilm S.A., Argentina) como soporte, a estas se les impregnó por inmersión durante 30 min, una solución al 10% w/w de 80% de Lipoid ® S100 y 20% de Colesterol (Sigma Aldrich®) disperso en 2 ml de n-octanol (Tabla 7) y posteriormente fueron montadas entre el compartimiento donador y receptor.

Tabla 7. Composición de la membrana artificial utilizada para estudios de liberación mediante la permeabilidad de isoniazida.

Composición de la membrana artificial	
n-octanol	90%
Lípidos	10% <ul style="list-style-type: none"> • Colesterol 20% • Lipoid S100 80% (Fosfatidilcolina de soja 94%)

Las dos fases fueron termostatizadas a 37.5 °C a ambos lados de las celdas de difusión en un baño de circulación. Se utilizó una solución reguladora de fosfatos

(SRF) 0.01 M de pH 7.4 como medio de difusión en las celdas donadora y receptora. Muestras de INH y de los biomateriales se suspendieron en la SRF (en una concentración equivalente a la dosis oral: 300 mg) posteriormente fueron introducidos en el compartimiento donador. Las soluciones dentro del compartimiento fueron sometidas a agitación mecánica a 14000 rpm (Auto Science ®). Se tomaron alícuotas de 2 ml del compartimiento receptor en intervalos definidos (5 min, 10min, 15, min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 6h y 8h) el volumen extraído fue sustituido con SRF.



Figura 13. Ensayo de permeabilidad con celdas de difusión de Franz.

La concentración de isoniazida fue determinada por espectroscopia UV visible (espectrofotómetro UV visible Agilent Technologies ® Cary 60) a una longitud de onda de 263 nm.

Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app} ; cm s^{-1}) son un factor limitante para predecir con mayor aproximación el fenómeno de la permeación, fueron

calculados a partir de la pendiente de la porción inicial de los perfiles de permeación, de acuerdo a la siguiente ecuación, la cual se deriva de la primera ley de Fick:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{A \cdot C_0 \cdot 60}$$

Donde dQ Es la cantidad acumulativa permeando en función del tiempo (mg/ml), V es el volumen del compartimiento receptor, A es el área de superficie de la membrana, C_0 es la concentración inicial del fármaco en el compartimiento donador y 60 es el factor de conversión de minutos a segundos [30].

A partir de estudios previos fue posible demostrar la aplicabilidad y la eficacia predictiva de la membrana debido a que se observó una buena correlación entre los %Fa y los valores de P_{app} obtenidos mediante el método desarrollado a través de la evaluación de 14 compuestos (Aciclovir, atenolol, furosemida, hidroclorotiazida, cloranfenicol, alopurinol, teofilina, naproxeno, verapamilo, carbamazepina, propranolol, cafeína, ketoprofeno y antipirina), los cuales son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva y representan un amplio rango de características de absorción, diversidad estructural, de comportamiento ácido-base y solubilidades.

$$\%Fa = (1 - e^{-A \cdot P_{app}}) \times 100$$

La apropiada correlación de los datos fue evidenciada por un valor de r^2 de 0.8517 (A) con un coeficiente de correlación de -2.3 ± 0.4 [30].

6. RESULTADOS y DISCUSIONES

6.1 Biomateriales Sintetizados

Se obtuvieron los cuatro biomateriales por la técnica sol-gel (Figura 14) de acuerdo a las condiciones de síntesis establecidas. Tomando en cuenta que el proceso sol-gel implica la transición de un sistema en suspensión, “sol” a una fase sólida “gel” y que las reacciones más importantes durante su proceso son la hidrólisis y condensación, estas ocurrieron en diferentes tiempos de acuerdo a la relación TEOS/Agua y a los pH utilizados en cada uno de los biomateriales favoreciendo la gelificación en algunos casos.

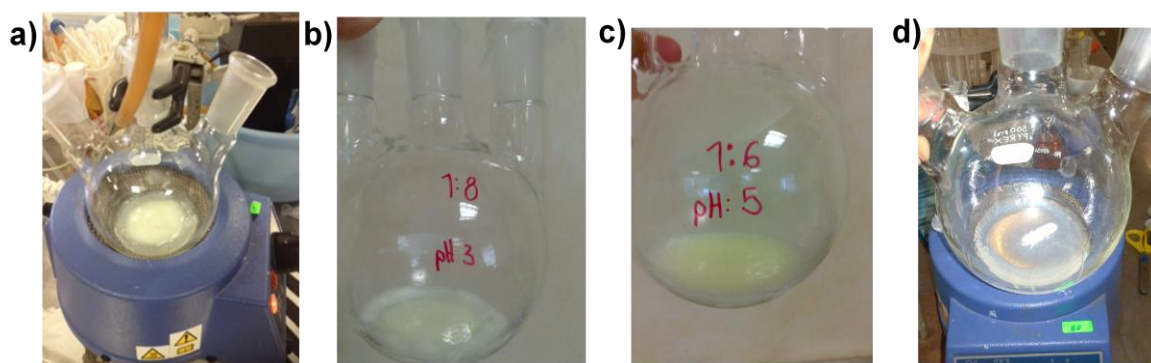


Figura 14. Biomateriales sintetizados por la técnica sol-gel. a) B5.1.8, b) B3.1.8, c) B5.1.6 y d) B3.1.6.

Las condiciones ácidas durante el proceso sol-gel favorecen la hidrólisis de los alcóxidos, sin embargo retardan las reacciones de condensación. Dado que el pH afecta considerablemente a la cinética de reacción y así mismo a la estructura del biomaterial, se observó que el tiempo de gelación fue diferente entre los biomateriales, los que fueron sintetizados a pH 3 el proceso de gelación fue más

rápido, por el contrario los sintetizados a pH 5 el proceso de gelación fue más lento.

Con el fin de acelerar el proceso de gelificación se agregó NH_4OH en cada una de las reacciones. La adición de este compuesto gota a gota genera iones OH^- lentamente, lo cual permite obtener una nucleación homogénea entre los grupos OH de la sílice, evitando que se presente mayoritariamente la agregación de cúmulos desordenados, y de esta manera, controlar la velocidad de reacción, en este caso la gelificación [47].

La polimerización se puede efectuar en medios ácido o básico. Cuando se da en condiciones básicas se obtiene un gel polimérico denso con poca elasticidad, en cambio en condiciones ácidas se obtiene un gel polimérico mayormente elástico cuando este se encuentra húmedo, una vez que es secado aumenta considerablemente su rigidez. Estos últimos fenómenos se pudieron observar en cada uno de los biomateriales. Es por esta razón que los biomateriales sintetizados a pH 3 (B3.1.6 y B3.1.8) iniciaron la gelificación incluso poco antes de agregar el NH_4OH [7].

6.2 Caracterización de los biomateriales

6.2.1 Análisis térmicos de isoniazida, sílice y biomateriales secos.

En la gráfica de ATG-ATD para isoniazida (Figura 15) se observa un pico endotérmico en la curva de ATD aproximadamente a $170\text{ }^\circ\text{C}$, el cual corresponde a la temperatura de fusión de este fármaco ($171.4\text{ }^\circ\text{C}$) [21]. El pico exotérmico que se observa aproximadamente a $350\text{ }^\circ\text{C}$ corresponde a la temperatura de

descomposición, lo cual concuerda con la pérdida del 100% del peso en la curva de ATG. Estos resultados dieron la pauta para establecer las condiciones de trabajo para la síntesis del biomaterial conteniendo isoniazida (específicamente la temperatura de calcinación).

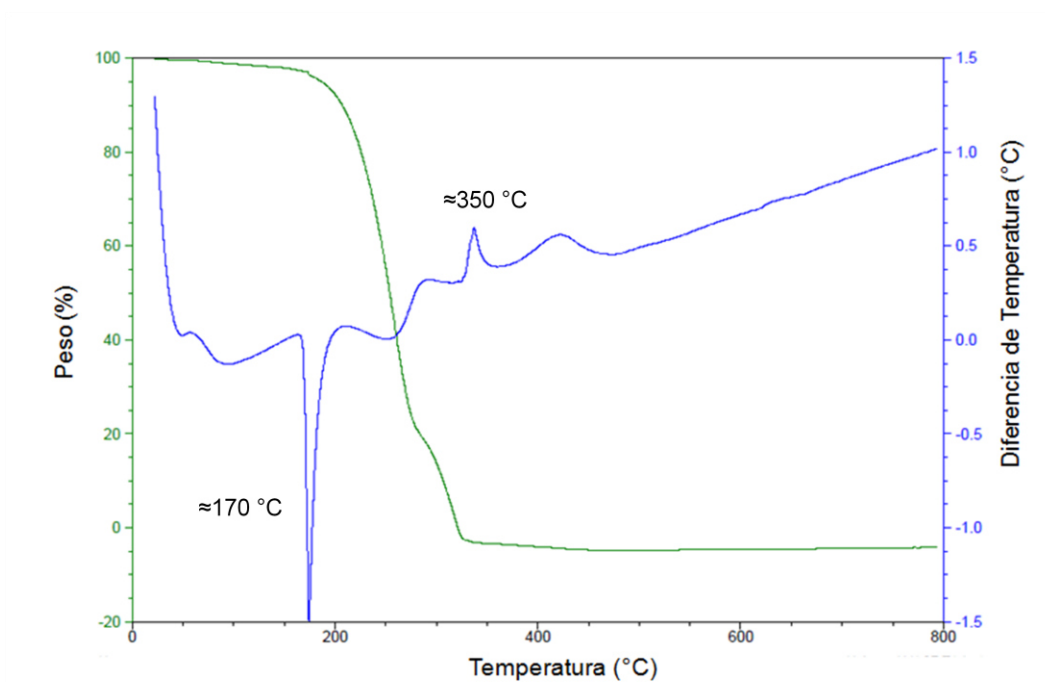


Figura 15. ATG-ATD isoniazida.

En la figura 16 se presenta la gráfica correspondiente al tratamiento térmico del gel fresco de la sílice. La pérdida en peso de aproximadamente 18% que se observa hasta 800 °C se atribuye a los procesos de desorción y evaporación de los solventes ocluidos en el gel [2].

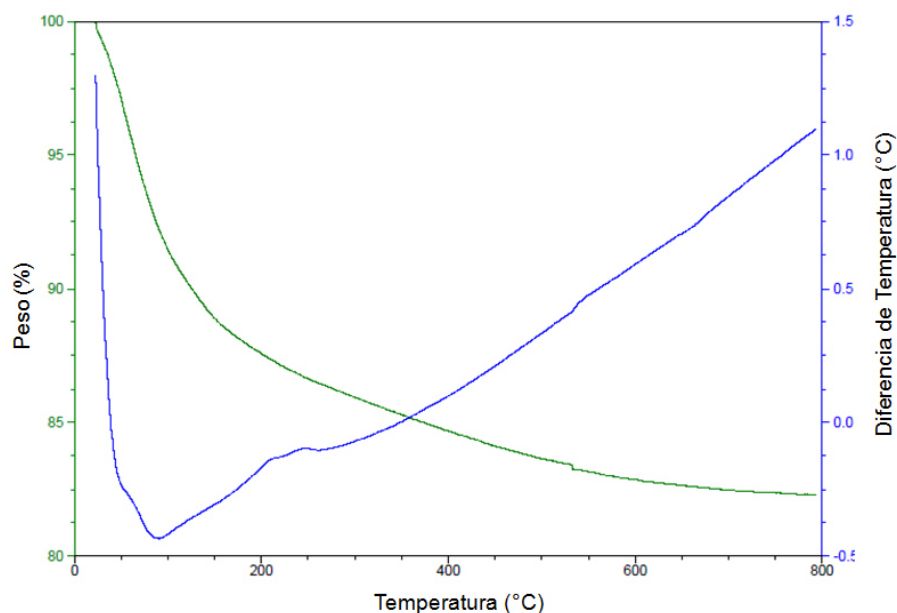


Figura 16. ATG-ATD SiO₂.

Los resultados del análisis termogravimétrico ATG y térmico diferencial ATD de los biomateriales (Figura 17) mostraron un comportamiento similar. En estas gráficas se observa una primera pérdida (5%) en peso aproximadamente a 70°C atribuida a la evaporación de residuos de etanol, la segunda a 100°C corresponde a la evaporación y desorción de agua, mientras que la tercer pérdida (15%) aproximadamente a los 260°C corresponde a la combustión de residuos de los precursores. En un estudio realizado por López y col. [42] se reporta que aproximadamente a los 80 °C ocurre la desorción del agua que fue adsorbida en la superficie y ocluida en el interior de los poros. Así mismo a 260 °C la pérdida en peso fue atribuida a la eliminación de los grupos silanoles formados sobre la superficie, señalando que la remoción de estos grupos no es completa incluso cerca de los 800 °C.

En la figura 17 se observa en cada una de las gráficas de ATD el pico endotérmico característico de fusión de INH (171.4 °C), el cual no está muy definido debido a la baja proporción (20%) de fármaco incorporado en el biomaterial y a la dispersión de éste en la matriz de la sílice [48].

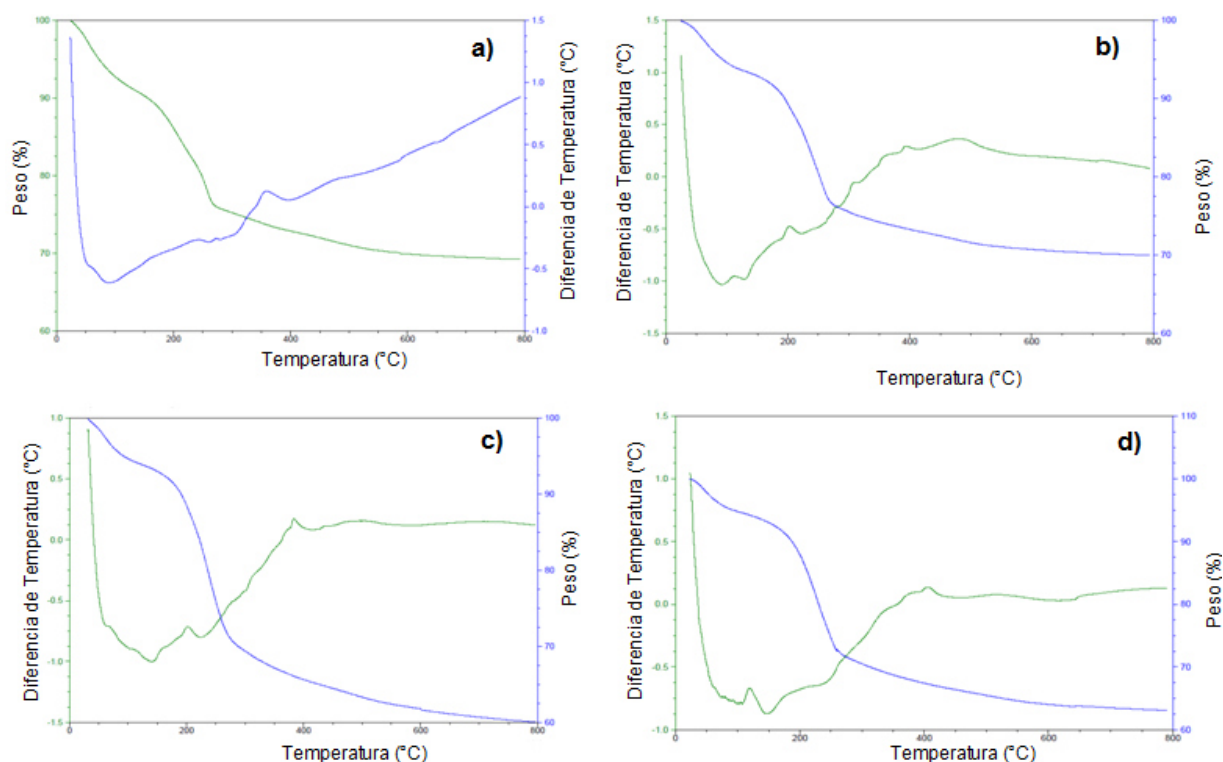


Figura 17. ATG-ATD Biomateriales a) B5.1.8, b) B5.1.6, c) B3.1.8 y d) B3.1.6.

6.2.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El espectro obtenido para isoniazida (Figura 18), muestra las principales bandas, las cuales corresponden a los movimientos de estiramiento del grupo carbonilo de la amida ($\approx 1740\text{ cm}^{-1}$), de la amina secundaria ($\approx 1634\text{ cm}^{-1}$) y flexión del enlace N-H ($\approx 3400\text{ cm}^{-1}$) [26]. Sullad y col. refieren la banda N-H de flexión (3303 cm^{-1}) y mencionan que las bandas de estiramiento C-H (3112 cm^{-1}) y $\text{C}=\text{C}$ (1602 cm^{-1})

del anillo aromático no son de menor importancia y deben ser consideradas también para la caracterización por IR de la isoniazida [48].

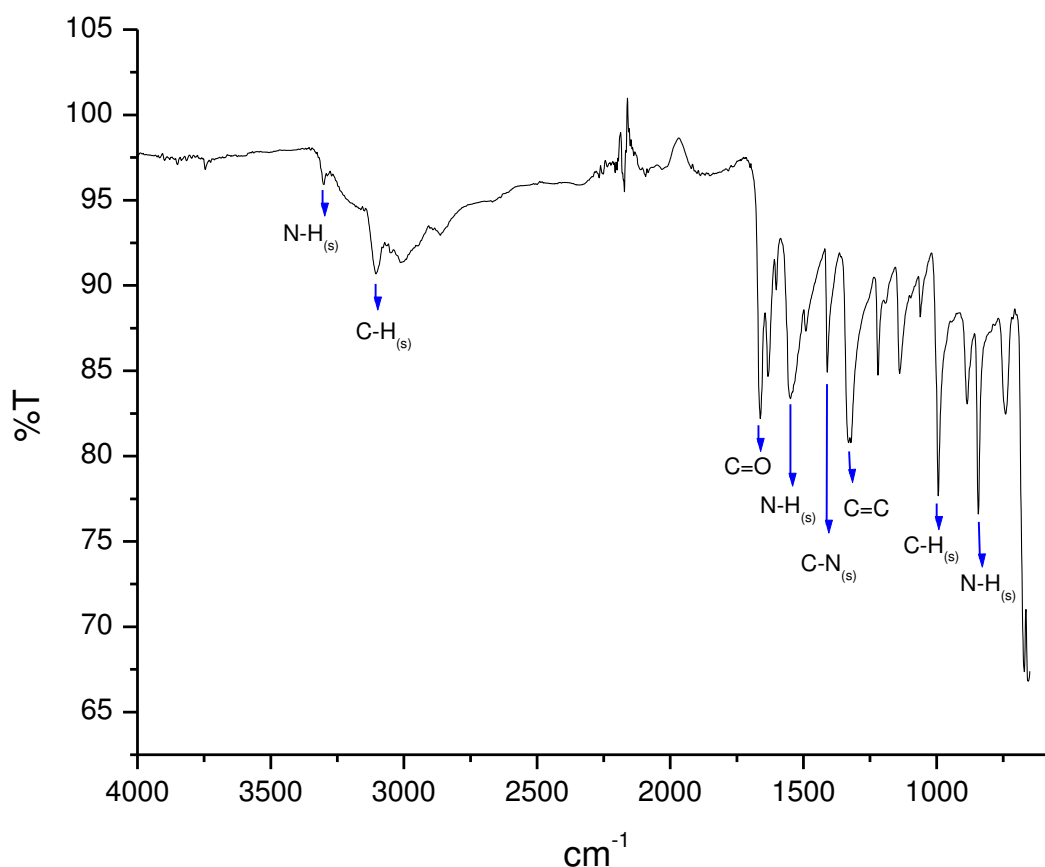


Figura 18. Espectro FTIR de isoniazida.

En los espectros FTIR de los biomateriales (Figura 19) se observa una banda sobresaliente alrededor de los 1740 cm⁻¹, la cual no se observa al hacer la comparación con el espectro de la sílice. Dicha banda corresponde al grupo carbonilo de la isoniazida y es encontrada en cada uno de los biomateriales sintetizados en las cuatro diferentes condiciones. Es evidente que la banda se

observa con menor intensidad, debido a la baja proporción de INH incorporada en la sílice [49].

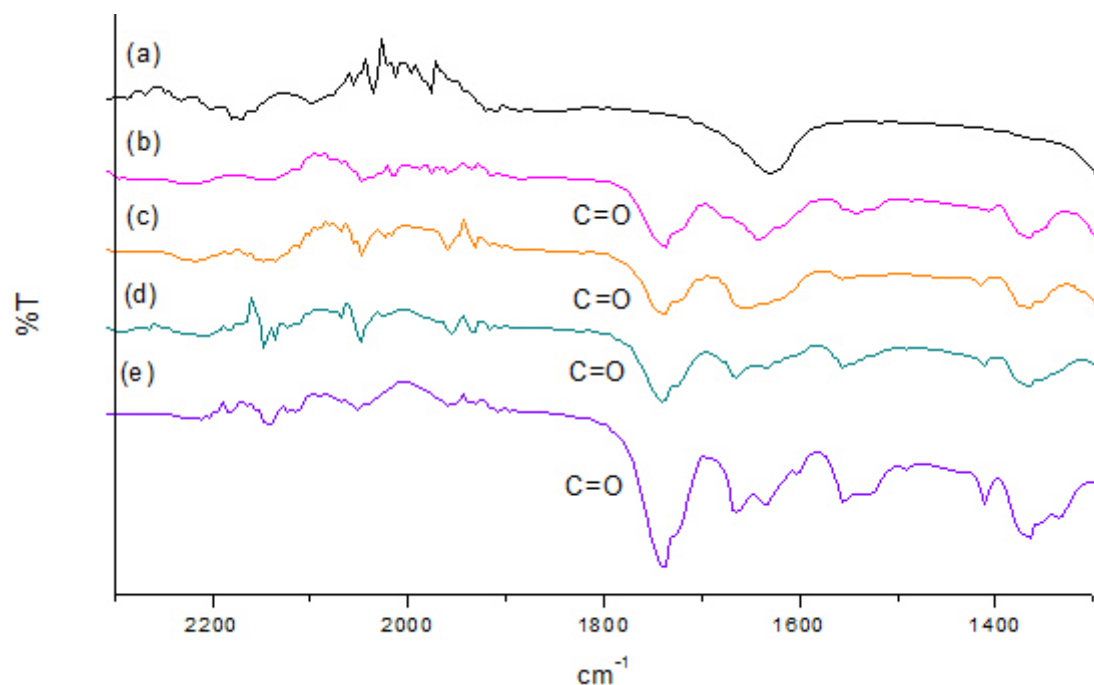


Figura 19. Espectro de los biomateriales sintetizados (b) B5.1.8, (c) B5.1.6, (d) B3.1.8, (e) 3.1.6 y la (a) sílice.

6.2.3 Difracción de rayos-X

El patrón de difracción de la Isoniazida (Figura 20, f) muestra reflexiones intensas y definidas en 2θ de 12, 14, 16 y 20°, las cuales son características de su estructura cristalina. En la figura 20 a se muestra el difractograma de la sílice sin incorporar el fármaco donde se puede observar un pico ancho entre 20-30° de 2θ , indicado que es amorfa [28]. Los estudios de difracción de rayos-X para los biomateriales revelan que las reflexiones características de la INH se traslapan con el pico ancho correspondiente a la matriz de SiO₂. Sin embargo, los difractogramas (Figura 22 b, c, d y e) de los biomateriales se pueden observar

algunas reflexiones sobresalientes a las del SiO_2 , las cuales confirman la presencia de INH en la matriz cerámica.

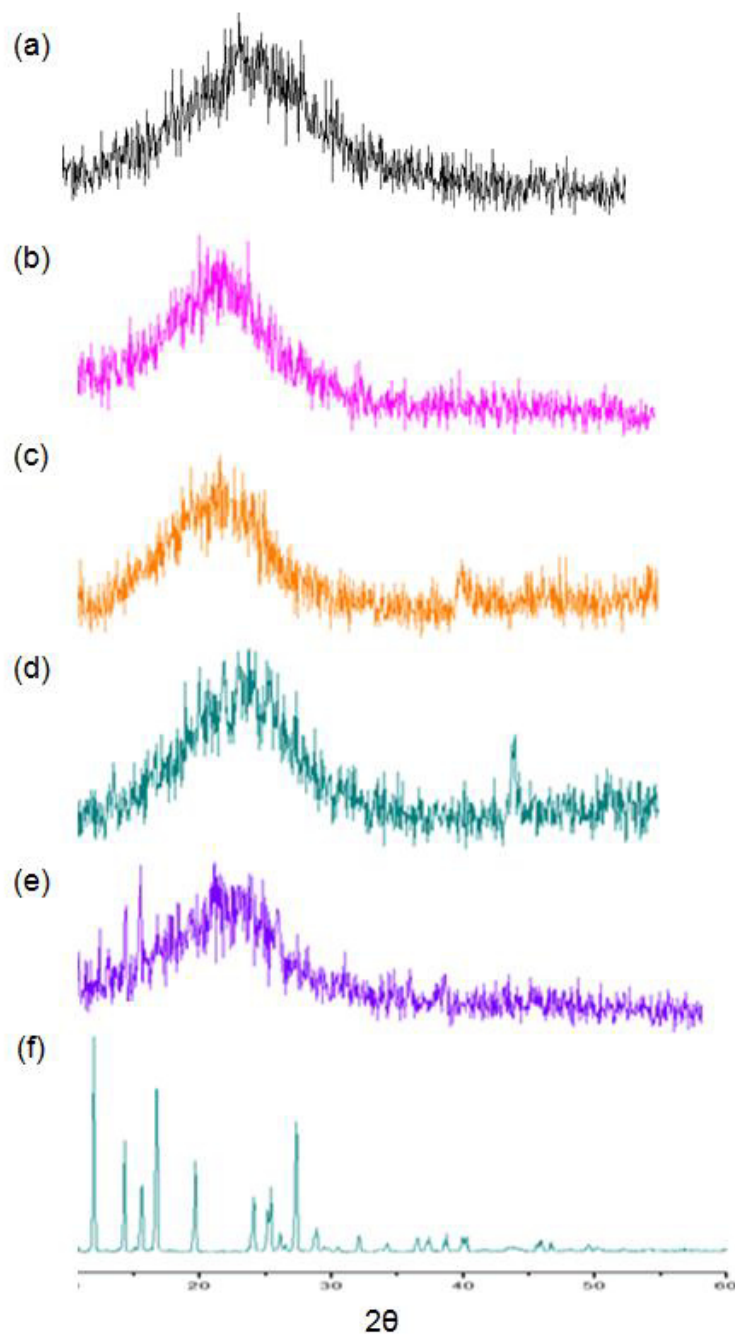


Figura 20. Patrones DRX (a) SiO_2 , (b) B5.1.8, (c) B5.1.6, (d) B3.1.8, (e) B3.1.6 y (f) INH.

6.2.4 Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (MEB-EDX)

Es importante conocer la morfología, el tamaño y la distribución de las partículas que conforman el material, dichas características dependen directamente de las condiciones de síntesis.

El contenido de agua durante la síntesis Sol-Gel es un punto crítico en la morfología y distribución de las partículas. Cuando se utiliza una mayor proporción de agua en la reacción, se permite que los agregados formados durante el proceso de envejecimiento del gel se compacten y se reorganicen, lo que conduce a partículas de mayor tamaño y a una disminución de la agregación entre ellas después de su secado. Por lo contrario con un bajo contenido de agua, desde su formación los agregados son más compactos y como resultado sus partículas no crecen durante el envejecimiento, ya que el reordenamiento se ve obstaculizado, favoreciendo la agregación de las partículas [42].

En la Figura 21 se muestran las micrográficas de MEB de los biomateriales sintetizados por sol-gel. En todas las imágenes se observan formas esferoidales, presentando una mayor homogeneidad en el tamaño nanométrico de las partículas ($\approx 1-7 \mu\text{m}$) en las muestras a, b y d, las cuales corresponden a la sílice sin INH y a los biomateriales que fueron sintetizados con mayor proporción de agua, es decir una relación TEOS/ Agua 1:8. En las muestras c y e se observan partículas con mayor variedad de tamaños ($\approx 0.4- < 0.1 \mu\text{m}$) formando microagregados esféricos.

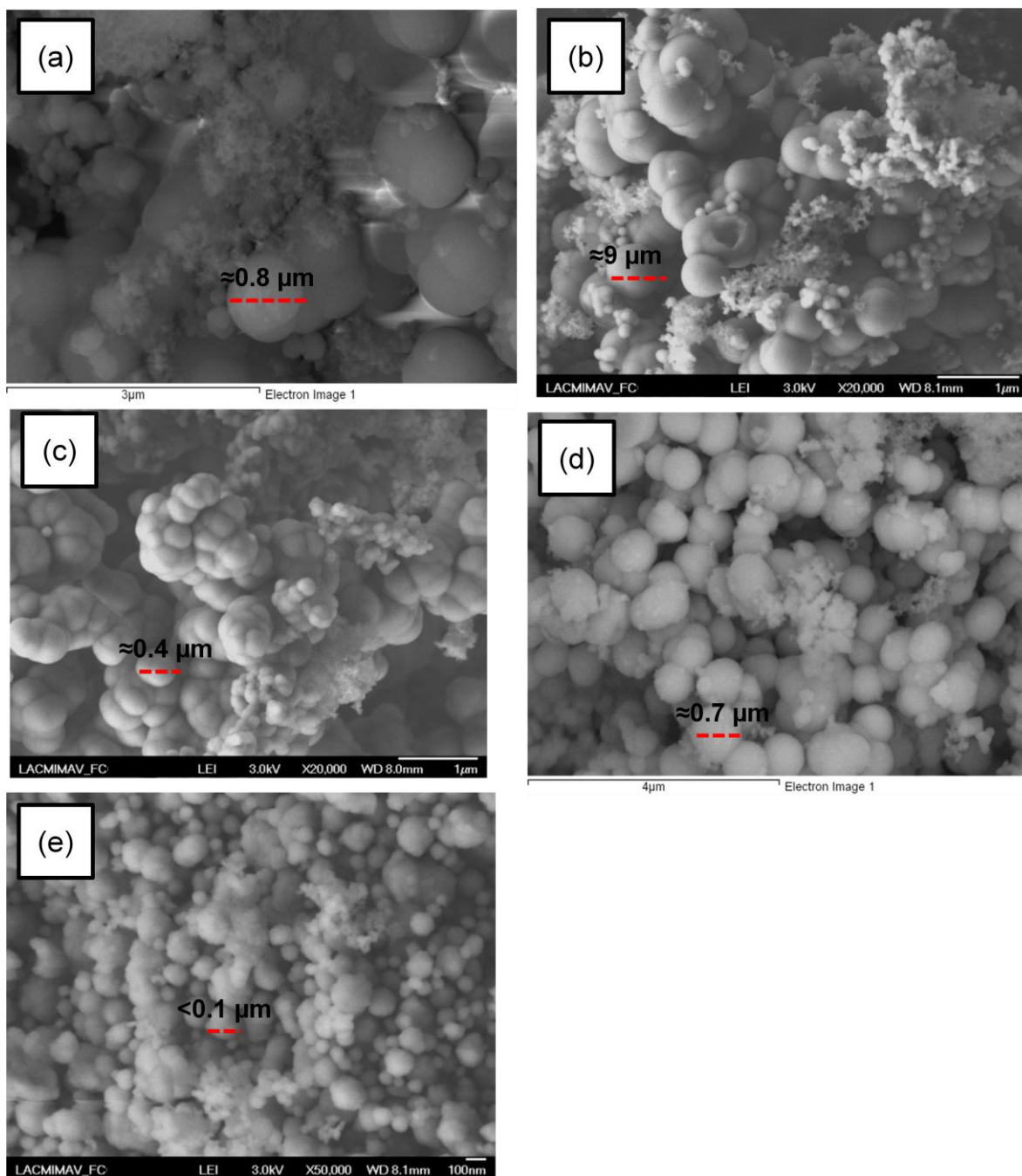


Figura 21. Micrografías de las muestras analizadas sintetizadas por sol-gel (a) SiO_2 , (b) 5.1.8, (c) B5.1.6, (d) B3.1.8 y (e) B3.1.6.

6.2.5 Espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS)

El análisis por EDS para la sílice sin INH (Figura 22) indica la composición química, constituida por O (51.61%) y Si (48.39%), mientras que las gráficas de los biomateriales (b, c, d y e) muestran la línea de emisión del carbono, adicionalmente a las de los elementos O y Si, la cual se atribuye a la presencia de INH en la sílice. El Nitrógeno no pudo ser detectado por esta técnica, debido a que es un elemento muy liviano y a la baja proporción de éste en el fármaco.

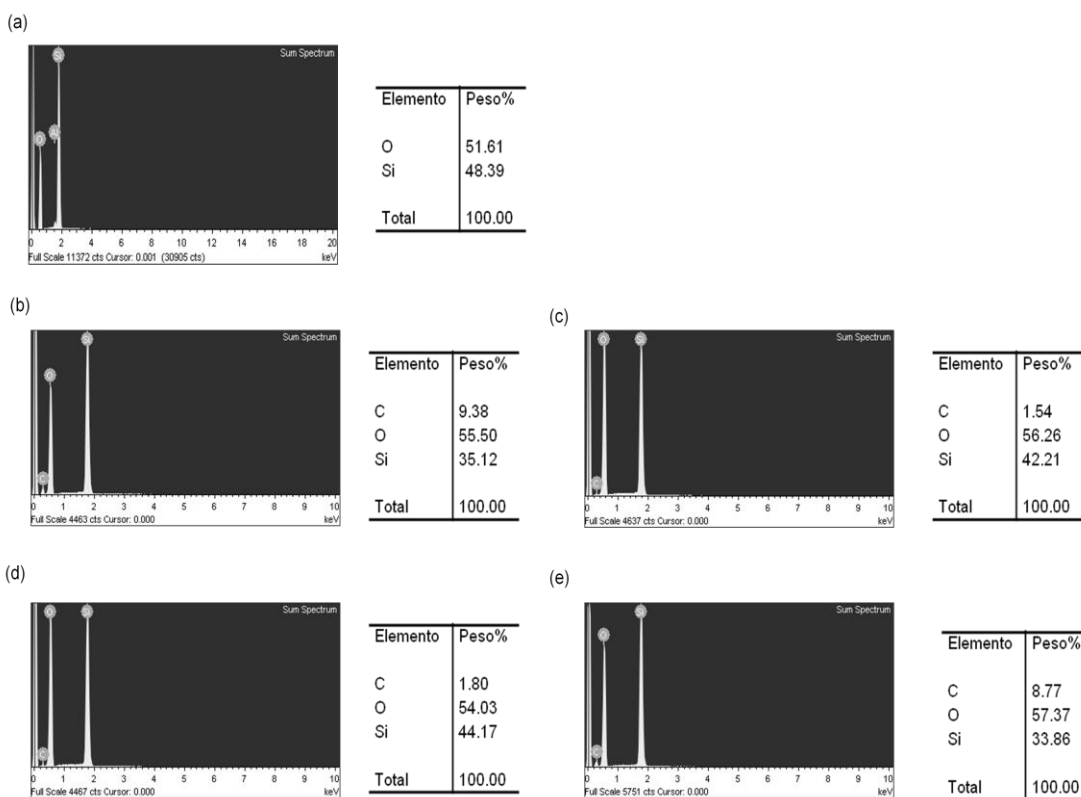


Figura 22. Análisis EDS y porcentaje de los pesos de los elementos a partir de la sílice (a) y biomateriales: (b) B5.1.8, (c) B5.1.6. (d) B3.1.8 y (e) B3.1.6.

Debido a que EDS es una técnica semicuantitativa, las muestras de los biomateriales fueron sometidas a análisis elemental por combustión. Los resultados de este estudio (Tabla 9) revelan la presencia de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno en cada uno de ellos, siendo los biomateriales 3.1.8 y 5.1.8 los que obtienen un mayor porcentaje de estos elementos, por lo tanto una mayor incorporación de isoniazida en la matriz cerámica.

Tabla 8. Resultados de análisis elemental.

<i>Muestra</i>	<i>% Carbono</i>	<i>% Hidrógeno</i>	<i>% Nitrógeno</i>
<i>B 3.1.8</i>	5.20	0.01	2.47
<i>B 3.1.6</i>	4.67	0.01	2.28
<i>B 5.1.6</i>	4.36	0.01	1.97
<i>B 5.1.8</i>	5.02	0.03	2.20

6.2.6 Análisis textural

En la Figura 23 se muestran las isotermas de adsorción-desorción de los biomateriales analizados. Todas las isotermas obtenidas corresponden al tipo V de acuerdo con la clasificación BDDT (Brunauer, Deming, Deming y Teller). Este tipo de isotermas se caracterizan por la presencia de mesoporos y de pobres interacciones entre el adsorbente y adsorbato [50].

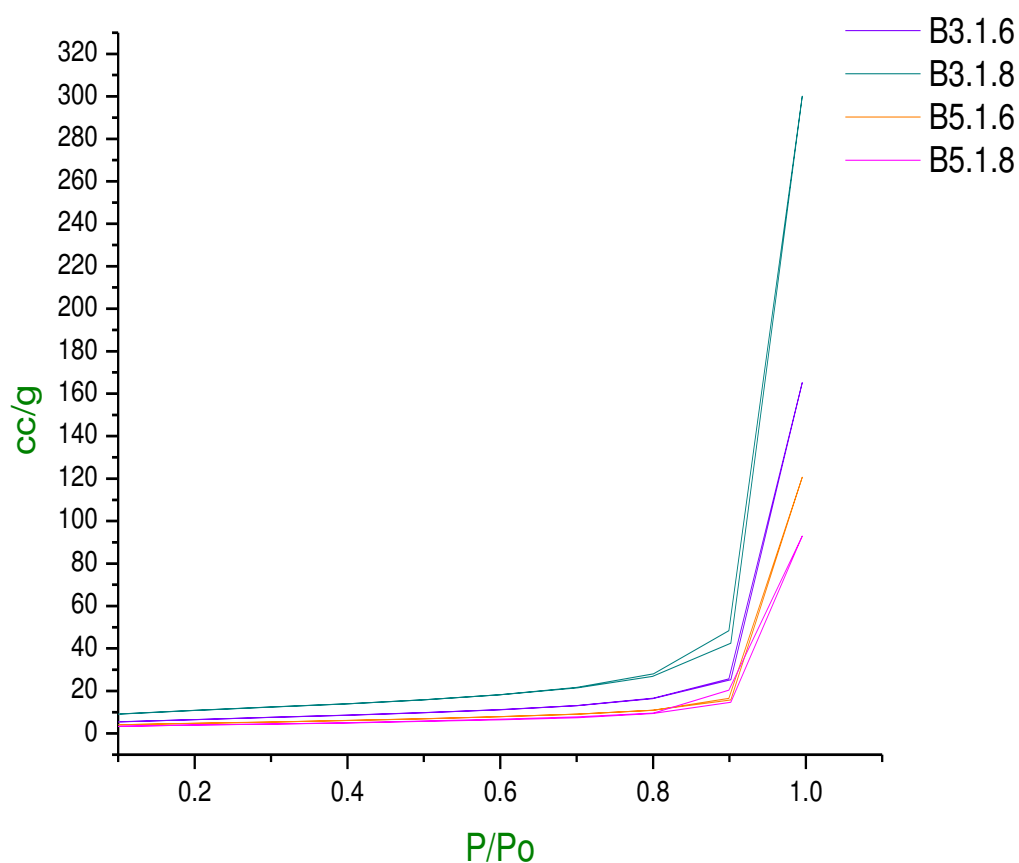


Figura 23. Isotermas de adsorción de N₂ para los biomateriales sintetizados.

Cada una de las isotermas obtenidas de los biomateriales están asociadas a estructuras porosas, la mayoría de los óxidos inorgánicos (geles de sílice) originan

forma de lazo de histéresis tipo H_2 , éstas muestran características de estructuras porosas que presentan el efecto de bloqueo de poro. Cuanto mayor sea el bloqueo, más ancho será el lazo de histéresis en las isothermas [50].

A partir de estas isothermas se calcularon los valores de área superficial específica por el método BET (Brunauer-Emmet-Teller) y la porosidad por el método BJH (Barret-Joyner-Halenda). Los valores se resumen en la Tabla 9, los cuales muestran que los biomateriales sintetizados a pH 3 (B3.1.8 y B 3.1.6), tienen una mayor área superficial, propiciada por la velocidad de las reacciones de hidrólisis y condensación durante la síntesis.

Tabla 9. Características texturales obtenidas a partir de las isothermas de adsorción-desorción de los materiales.

Biomaterial	Área superficial S_{Bet} , m^2/g	Volumen total de poro V_p , cc/g	Diámetro promedio de poro d_p , nm
B5.1.8	13.87	0.1425	5.687
B5.1.6	16.65	0.1845	5.720
B3.1.8	38.75	0.4604	5.709
B3.1.6	23.79	0.2536	2.837
SiO_2	12.28	0.3817	1.8

6.4 Pruebas de Extracción

Los resultados (Tabla 10) muestran que en la condición 1 (buffer de fosfatos pH 7.1, 325 rpm, 45°) y condición 2 (buffer de fosfatos pH 7.1, 300 rpm, 37.5 °C), la máxima extracción de isoniazida se alcanzó con los biomateriales que fueron sintetizados a una relación TEOS/Agua 1:8.

Tabla 10. Resultados de extracción de los biomateriales sintetizados vía sol-gel.

Biomaterial	Condición 1	Condición 2
3.1.6	28.1%	27.2%
3.1.8	46.9%	39.2%
5.1.6	44.6%	38.4%
5.1.8	46.7%	45.9%

El análisis elemental (Tabla 11) por combustión revela que tras haberse sometido a una primera extracción (24 horas) y posteriormente a una segunda (48 horas) el biomaterial 3.1.8 sigue revelando la presencia de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno, evidenciando la presencia de isonizida en la matriz cerámica e indicando que la extracción en las condiciones estudiadas no fue completa.

Tabla 11. Análisis elemental del B 3.1.8 después de la extracción.

<i>Muestra</i>	<i>% Carbono</i>	<i>% Hidrógeno</i>	<i>% Nitrógeno</i>
<i>Extracción 1</i>	1.78	0.01	0.58
<i>Extracción 2</i>	1.72	0.0	0.63

6.5 Estudios de los perfiles de liberación

Se consideró para los perfiles de liberación de isoniazida un comportamiento en dos fases: la primera que se caracterizó por una liberación rápida inicial “corta duración” y la segunda que muestra una liberación sostenida “larga duración”. Esto con el fin de llegar a un análisis más detallado del comportamiento de la cinética de liberación de isoniazida a través de las matrices cerámicas de sílice sintetizadas en diferentes relaciones TEOS/Agua.

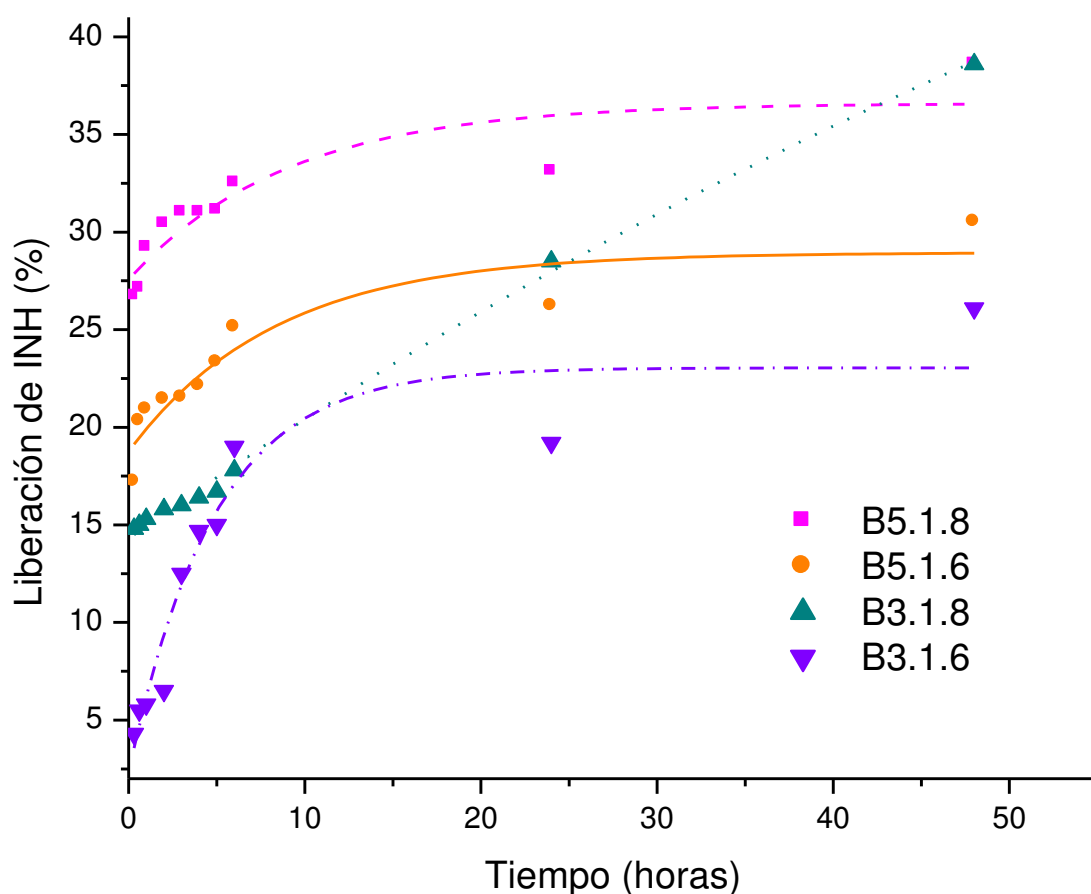


Figura 24. Cinética de liberación de isoniazida en la primera fase “Corta duración”.

La Figura 24 muestra la cinética de liberación de corta duración, la cual se evaluó en las primeras 48 horas. La liberación ocurre de manera rápida para cada uno de los biomateriales, el B 3.1.6 fue el que presentó menor liberación (26.1%), enseguida el B5.1.6 con 30.5%, los biomateriales B3.1.8 y B5.1.8 son los que alcanzaron una liberación mayor con un de 38.6% y 38% respectivamente.

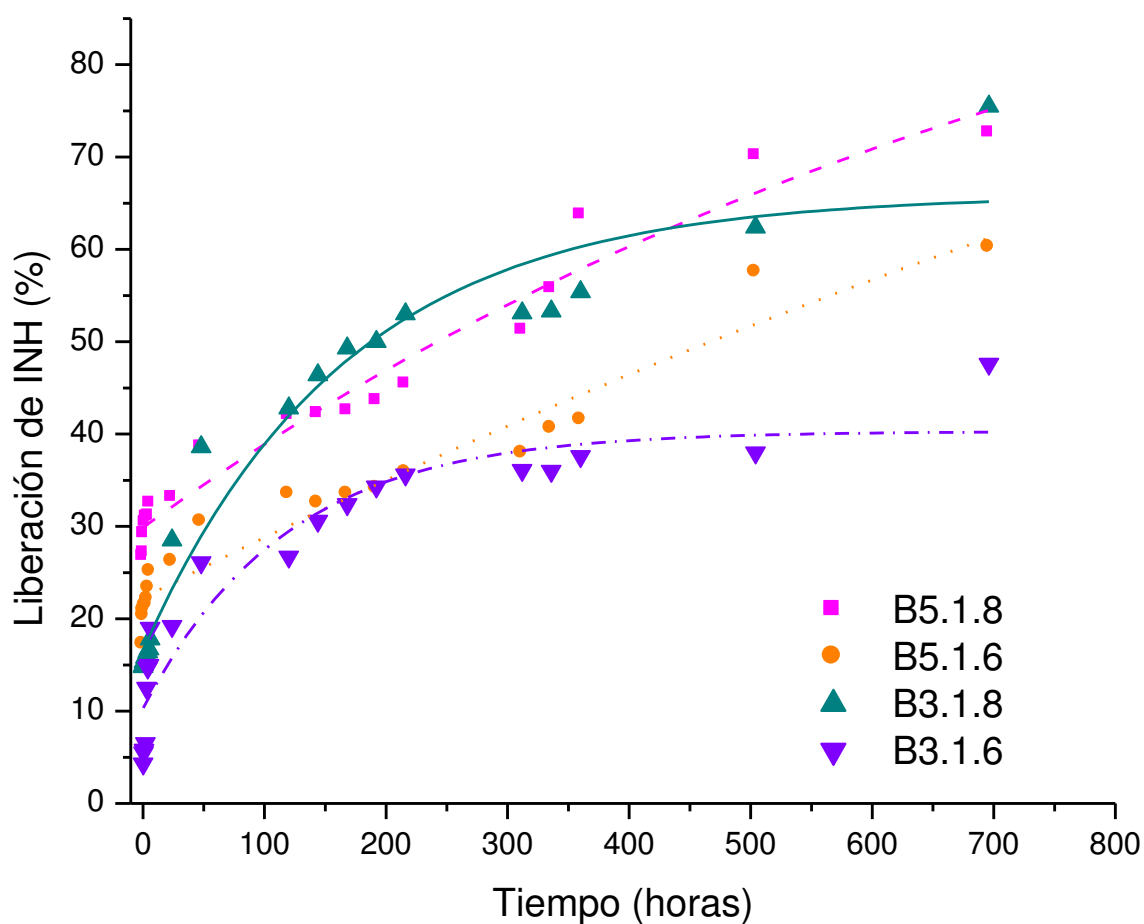


Figura 25. Cinética de liberación Fase 1 "Corta duración" y 2 "Larga duración".

La segunda fase de la cinética de liberación “larga duración”, se llevó a cabo en un lapso de 29 días (696 horas) comenzando a partir de 48 horas. A partir de la segunda fase (48 horas en adelante) la liberación ocurre de manera más lenta en cada uno de los biomateriales.

El comportamiento de las dos fases (Figura 25) de la cinética se atribuye a que la primera se da por la isoniazida que fue incorporada en los macroporos de la matriz, favoreciendo su pronta liberación en las primeras horas. Enseguida la segunda fase muestra una liberación más lenta atribuida principalmente a la difusión de isoniazida a través de los nanoporos, limitando así su pronta liberación de la matriz, López y col. reportaron este mismo fenómeno en un estudio previo con hidrocortisona [28].

Los resultados de las pruebas de liberación indican que los biomateriales sintetizados en mayores proporciones de agua (TEOS/Agua 1:8) presentaron un mayor porcentaje de liberación del fármaco. El biomaterial B3.1.8 fue el que alcanzó el mayor porcentaje de liberación de isoniazida con un 75.5% seguido del B5.1.8 con 72.6%, posteriormente el B5.1.6 con un 60.2% y finalmente el B3.1.6 con un 47.6%. Este comportamiento concuerda con las características texturales de los biomateriales, ya que la mayor liberación se presenta en los biomateriales con mayor tamaño de partícula (B3.1.8 y B5.1.8) y en especial en el que posee mayor área superficial (B3.1.8). Por lo tanto la velocidad de liberación de la isoniazida incorporada en la matriz de SiO_2 fue determinada por el arreglo en la red de poros internos de la matriz.

Ciriminna y col. señalaron que los perfiles de liberación están determinados por la estructura interna de las partículas [9], tal como el volumen y tamaño de poro, además del área superficial. Albarran y col. [12] sugirieron adicionar a estos factores una combinación de los procesos de disolución y difusión por parte del fármaco en la matriz. Andersson y col. indicaron que el principal mecanismo para la liberación del fármaco es la difusión y que depende en gran medida de la conectividad de los poros y su geometría, así como de la estabilidad acuosa de la matriz [51].

Vallet y col. indicaron que las matrices cerámicas pueden ser ordenadas o desordenadas, si la distribución de poros de la matriz cerámica es ordenada, la absorción y liberación del fármaco será mayormente homogénea [2]. Los resultados de SEM indican una mayor homogeneidad en las partículas obtenidas para el biomaterial B3.1.8, lo que en relación a lo mencionado anteriormente y haciendo comparaciones con los resultados del análisis de las isothermas de adsorción y desorción coincide con que el tamaño de poro y la uniformidad aparente de su red mesoporosa benefició la liberación de isoniazida a través de la matriz de dióxido de silicio.

6.6 Estudio de la liberación de INH a partir de biomateriales mediante un sistema de difusión dinámico empleando membranas artificiales

Para estudiar el efecto que tiene un sistema bicompartimental en la liberación de la isoniazida contenida en matrices de sílice, simulando parcialmente el proceso de absorción, se utilizaron celdas de de difusión de Franz. Los resultados del estudio de liberación, empleando membranas artificiales (Figura 26) muestran una menor difusión del fármaco a partir de los biomateriales comparado con el comportamiento de la isoniazida libre, así mismo se observa que los biomateriales muestra un comportamiento similar respecto a la liberación del fármaco durante las primeras 8 horas.

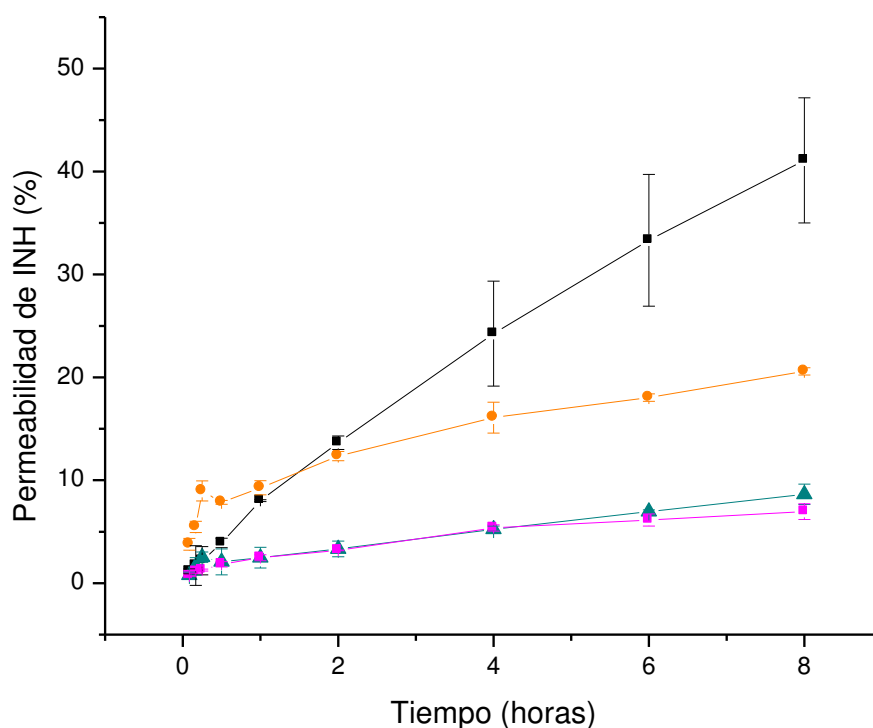


Figura 26. Perfiles de permeabilidad de INH (■), B5.1.8 (■), B5.1.6 (●) y B3.1.8 (▲).

El valor de P_{app} de INH fue de $1.80 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, siendo el %Fa predicho del 100% (Tabla 10), por lo que en base a estos resultados es posible afirmar que este fármaco presenta alta permeabilidad [30].

Tabla 12. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) y fracción de dosis absorbida (Fa%) obtenidos para INH y los biomateriales.

Muestra	$P_{app} (\times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1})$	%Fa
INH	1.80	100
B5.1.8	0.17	99.999
B5.1.6	2.57	99.728
B3.1.8	1.98	100

Los %Fa para B3.1.8, B5.1.8 y B5.1.6 fueron superiores al 99%, indicando que la permeabilidad de INH no fue afectada al ser incorporada en estos biomateriales, tras el beneficio de la aplicación de estos sistemas como estrategias para la modulación de la liberación de INH. Además, los perfiles de permeabilidad de INH a partir de los biomateriales fueron más sostenidos respecto al del fármaco puro. Estos resultados concuerdan con los observados en la sección anterior, en los cuales se observó que al incorporarse la INH en la sílice se obtiene una liberación prolongada, indicando que la permeabilidad de INH a través de las membranas biológicas está determinada por la liberación del fármaco hacia el entorno acuoso de las mismas [30].

Sin embargo, los valores obtenidos a partir de B3.1.6 fueron bastante heterogéneos y poco reproducibles, lo que puede atribuirse principalmente a la

morfología poco homogénea que presenta este sistema, como fue descrito en los estudios de SEM, por lo que fue excluido de este estudio.

7. CONCLUSIONES

Por medio de la técnica sol-gel fue posible desarrollar un sistema a base de SiO_2 capaz de incorporar y liberar un fármaco de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis “isoniazida”. Mediante técnicas de espectroscopia infrarroja y difracción de Rayos-X se confirmó la presencia de isoniazida en la matriz de SiO_2 .

El análisis térmico demostró que la temperatura de calcinación empleada durante la etapa de envejecimiento y secado durante el proceso sol-gel no afecta su estabilidad. Se confirmó la cristalinidad de isoniazida por DRX y se demostró que la matriz de los biomateriales sintetizados por la técnica sol-gel es amorfa y que la isoniazida está incorporada en ella.

La cantidad de agua utilizada durante la síntesis sol-gel es el factor principal para favorecer las etapas de hidrólisis y la velocidad de gelificación. De estas reacciones depende el grado de porosidad, hidroxilación, grado de partículas aglomeradas y estructura de la sílice. Un tamaño de poro óptimo (mayor de 5.6 nm) facilita tanto la incorporación como la liberación de la isoniazida.

Las propiedades fisicoquímicas de liberación del fármaco a través de la matriz cerámica de sílice se ven afectadas por la relación TEOS/Agua consideradas en las síntesis, de los biomateriales sintetizados con mayor proporción de agua, fue el sintetizado a pH 3 el que presenta mayor liberación de INH.

Estudios cinéticos de la liberación de isoniazida del biomaterial mostraron que el proceso de liberación ocurre en dos fases, la primera con una liberación rápida

inicial seguida de una fase de liberación más lenta. Los factores que influyeron en esta cinética fueron el tamaño de poro y el grado de homogeneidad de las partículas. Para realizar ajustes en el perfil de liberación habría que estudiar la influencia de otros factores de las síntesis, como la temperatura de calcinación, la proporción de fármaco incorporado, la vía de incorporación de la isoniazida y la funcionalización de la sílice.

Por medio del estudio de permeabilidad fue posible predecir de una manera rápida, eficaz, económica y reproducible la permeabilidad del fármaco solo e incorporado en el SiO_2 , que es absorbido a través del mecanismo de difusión pasiva. Los valores de %Fa determinados para B3.1.8, B5.1.8 y B5.1.6 se mantuvieron por encima del 99%, demostrando así que la permeabilidad de INH no fue afectada al haberse incorporado la matriz de sílice.

La síntesis de una matriz a base de dióxido de silicio por la técnica sol-gel en condiciones TEOS/Agua 1:8 y pH 3 o 5, conteniendo isoniazida representa una alternativa para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación prolongada con potencial para constituir una forma farmacéutica para administración a través de un implante. El desarrollo de estos materiales cerámicos con propiedades que permitan la liberación prolongada del principio activo contribuye a reducir los efectos secundarios dependientes de la concentración plasmática y los problemas asociados al incumplimiento de la terapia por parte del paciente.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Martín, A., Bioactividad y Biocompatibilidad de Materiales Sol-Gel con constante en CaO, in Química Inorgánica y Bioinorgánica 2005, Complutense de Madrid: Madrid.
2. Vallet-Regi, M. and A. Doadrio, Liberación de Fármacos en matrices biocerámicas: Avances y perspectivas, R.A.d. Farmacia, Editor 2002: Madrid.
3. Soria, J.M., et al., Use of biomaterial in regenerative medicine, basic aspects and applications in the Nervous system Trauma Fund MAPFRE, 2009. 20(1): p. 15-22.
4. Aguilar, D.H., et al., Estudio de la cristalización de ZrO_2 en el sistema sol-gel: $\text{ZrO}_2\text{-SiO}_2$. Ciencia UANL, 2002. 6(1).
5. Arias, J., et al., Propedéutica Quirúrgica; preoperatorio, operatorio, postoperatorio. , Tébar, Editor 2004: México.
6. Galo, J., et al., Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures. Chem Rev, 2002. 102(11): p. 4093-4138.
7. Reyes, J.G., Aplicación de la Técnica Sol-Gel, 2003, Univerisidad de Colima: Colima, Méxicco.
8. Bang, A., et al., Evaluation of dysprosia aerogels as drug delivery systems: a comparative study with random and ordered mesoporous silicas. ACS Appl Mater Interfaces, 2014. 6(7): p. 4891-902.
9. Ciriminna, R., et al., The sol-gel route to advanced silica-based materials and recent applications. Chem Rev, 2013. 113(8): p. 6592-620.
10. USP, Farmacopea de los Estados Unidos de américa, Formulario Nacional. USP 37 NF 32., ed. USP. Vol. 3. 2014, E.E.U.U.
11. López, P., Preparación, caracterización y evaluación biológica de nanopartículas poliméricas para la liberación controlada del Paclitaxel, 2011, Universidad Complutense de Madrid: Madrid. p. 220.
12. Albarran, L., et al., Controlled release of IFC-305 encapsulated in silica nanoparticles for liver cancer synthesized by sol-gel. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. 384(1-3): p. 131-136.
13. Del Valle, M., M. Galán, and R. Carbonell, Drug Delivery Technologies: The Way Forward in the New Decade Americal Chemical Society, 2009. 48(5): p. 2475-2486.
14. Sateesh, J.M., et al., Evaluation of physiochemical and anti-tubercular activity of co-crystal of isoniazid with methyl parabe. Innovative Drug Discovery, 2013. 3(1): p. 10-27.
15. Mehanna, M., S. Mohyeldin, and N. Elgindy, Respirable nanocarriers as a promising strategy for antitubercular drug delivery. ELSEVIER, 2014. 187: p. 183-197.
16. OMS, Informe mundial sobre la tuberculosis 2013, 2013 Organización Mundial de la Salud p. 5.
17. Parikh, R. and S. Dalwadi, Preparation and characterization of controlled release poly- ϵ -caprolactone microparticles of isoniazid for drug delivery through pulmonary route. Powder Technology, 2014. 264: p. 158-165.
18. De la Vía, E., et al., Tuberculosis. ELSEVIER, 2011. 47(8): p. 10-14.
19. Jaime, L., et al., Evaluation of the control measures adopted against an epidemic of AIDS-related multidrug resistant tuberculosis in a latin-american hospital. ELSEVIER, 2006. 24(2): p. 71-76.

20. Kriza, A., et al., Synthesis and structural studies of complexes of Cu, Co, Ni and Zn with isonicotinic acid hydrazide and isonicotinic acid (1-naphthylmethylene)hydrazide. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2010. 75(2): p. 229-242.
21. FEUM, *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Décima edición ed. secretaria de Salud, ed. FEUM. Vol. 2. 2011, México.
22. De la Iglesia, A. and H. Morbidoni, Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniazida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Revista Argentina de Microbiología*, 2006. 38: p. 97-109.
23. Lexicomp, *Drug Information Handbook whit International trade names index*, Lexicomp, Editor 2012, International Edition: Hudson, Ohio
24. Pediamécum, *Isoniacida Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría* 2012. <http://www.pediamécum.es>.
25. PLM, *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*, PLM, Editor 2011: México.
26. Akyuz, S. and T. Akyuz, FT-IR and FT-Raman spectroscopic studies of adsorption of isoniazid by montmorillonite and saponite. *Vibrational Spectroscopy*, 2008. 48(2): p. 229-232.
27. Jayanthi, B., et al., Per oral extended release products-An overview *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011. 1(2): p. 50-55.
28. Lopez, T., et al., Cortisol controlled release by mesoporous silica. *Nanomedicine*, 2009. 5(2): p. 170-7.
29. Kansy, M., F. Senner, and G. Klaus, *Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes*. Medicinal Chemistry Society, 1998. 41(7).
30. Aloisio, C., *Complejos binarios y ternarios de fármacos hidrofóbicos modelos incorporados a sistemas nanoestructurados: caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica*. , in *Fármacos y Medicamentos 2014*, Universidad Nacional de Córdoba: Argentina.
31. Bruce, A., et al., *Introducción a la Biología Celular*, M.P. S.A., Editor 2006: Madrid, España.
32. Galbis, J., *Panorama Actual de la Química Farmacéutica*, J. Galbis, Editor 2004, Secretariado de Publicaciones Madrid, España.
33. Silverthorn, D., *Human physiology. An integrated approach.*, E.M. Panamericana, Editor 2008: Madrid, España.
34. Zheng, S., et al., Discovery of VOC-compliant TEOS sol and its application to SiO₂/novolac hybrid coatings. *Progress in Organic Coatings*, 2013. 76(2-3): p. 425-431.
35. Hench, L., et al., Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. . *Biomed. Mater.* , 1971. 2.
36. Vallet-Regí, M., A. Rámila, and R. del Real, A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater.*, 2001. 13(308-311).
37. Zhu, Y., Y. Fang, and S. Kaskel, Folate-Conjugated Fe₃O₄@SiO₂ Hollow Mesoporous Spheres for Targeted Anticancer Drug Delivery. *Americal Chemical Society*, 2010. 114(39): p. 16382-16388.
38. Peterson, A., et al., Pore structures in an implantable sol-gel titania ceramic device used in controlled drug release applications: A modeling study. *Applied Surface Science*, 2007. 253(13): p. 5767-5771.
39. Lebold, T., et al., Nanostructured Silica Materials As Drug-Delivery Systems for Doxorubicin: Single Molecule and Cellular Studies. *Americal Chemical Society*, 2009. 9(8): p. 2877-2883.
40. Xin, Y., et al., Bioactive SrTiO₃ Nanotube Arrays: Strontium Delivery Platform on Ti-Based Osteoporotic Bone Implants. *ACS NANO*, 2009. 3(10).

41. Lopez, T., et al., The effect of water on particle size, porosity and the rate of drug release from implanted titania reservoirs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010. 93(2): p. 401-6.
42. Lopez, T., et al., Influence of water/alkoxide ratio in the synthesis of nanosized sol-gel titania on the release of phenytoin. *Langmuir*, 2011. 27(7): p. 4004-9.
43. Hurley, L. and B. Andersen, Biodegradable implants from poly-(alpha-hydroxy acid) polymers for isoniazid delivery. *INT J TUBERC LUNG DIS* 1999. 3(11): p. 1015-1024.
44. Saifullah, B., et al., Sustained release formulation of an anti-tuberculosis drug based on para-amino salicylic acid-zinc layered hydroxide nanocomposite. *Chemistry Central* 2013. 7(72).
45. Livage, J., The Gel Route to Transition Metal Oxides *Journal of solid state chemistry*, 1986. 64: p. 322-330.
46. Kovaríková, P., et al., HPLC-DAD and MS/MS analysis of novel drug candidates from the group of aromatic hydrazones revealing the presence of geometric isomers. *EISEVIER*, 2008. 48: p. 295-302.
47. Picasso, G., et al., Preparación de nanopartículas de magnetita por los métodos sol-gel y precipitación: estudio de la composición química y estructura. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 2012. 78(3).
48. Sullad, A., L. Manjeshwar, and T. Aminabhavi, Novel pH-Sensitive Hydrogels Prepared from the Blends of Poly(vinyl alcohol) with Acrylic Acid-graft-Guar Gum Matrixes for Isoniazid Delivery. *Americal Chemical Society*, 2010. 49: p. 7323-7329.
49. Angadi, S., L. Manjeshwar, and T. Aminabhavi, Coated Interpenetrating Blend Microparticles of Chitosan and Guar Gum for Controlled Release of Isoniazid. *Americal Chemical Society*, 2013. 52: p. 6399-6409.
50. IUPAC, <NewClass.pdf>. *Pure Appl. Chem*, 1985. 66: p. 1739.
51. Andersson, J., et al., Influences of Material Characteristics on Ibuprofen Drug Loading and Release Profiles from Ordered Micro- and Mesoporous Silica Matrices. *Chem. Mater.*, 2004. 16(21): p. 4160-4176.